

Aus der Klinik für Innere Medizin III

Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Professor Dr. M. Böhm

**Die Rolle des TRIF-abhängigen inflammatorischen Signalwegs bei
Hypertrophie-induziertem myokardialem Remodeling**

**The role of TRIF-dependent inflammatory signaling in hypertrophic myocardial
remodeling**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: Stephanie Irene Bettink

geb. am: 11.01.1968 in Kaiserslautern

Dekan: Universitätsprofessor Dr. Michael Menger

1. Berichterstatter: Professor Dr. Veit Flockerzi

2. Berichterstatter: Professor Dr. Michael Böhm

Homburg, den 08.06.2016

*„ Je weiter sich das Wissen ausbreitet, desto mehr
Probleme kommen zum Vorschein. “*

Johann Wolfgang von Goethe

Folgende in dieser Disseration beschriebenen Methoden wurden nicht eigenhändig von mir durchgeführt:

1. TAC-OP: MTA der AG Prof. Dr. U. Laufs, Homburg/Saar
2. Echokardiographie: Dr. C. Körbel, Homburg/Saar
3. Working Heart: Dr. J.-C Reil, Lübeck

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....	VIII
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1. SUMMARY	3
2. EINLEITUNG	5
2.1. Kardiale Hypertrophie	5
2.1.1. Physiologische Hypertrophie	6
2.1.2. Pathologische Hypertrophie	7
2.2. Einfluss der pathologischen Hypertrophie auf die kardiale Architektur....	8
2.2.1. Remodeling der Kardiomyozyten	8
2.2.2. Aktivierung fetaler Gene im Zuge der Hypertrophie	9
2.2.3. Remodeling der extrazellulären Matrix	10
2.3. Signalwege der pathologischen Hypertrophie	11
2.4. Inflammation und Hypertrophie.....	12
2.4.1. Zytokine.....	13
2.4.2. Interferone.....	13
2.4.3. Toll-like Rezeptoren	16
2.4.4. Toll-like Rezeptor Signaling.....	19
2.4.5. MyD88- und TIRAP- Signalkaskade.....	19
2.4.6. MyD88-unabhängige Signalkaskade: TRIF	20
2.4.7. Die Bedeutung der Inflammation bei maladaptiven kardialen Remodeling	
22	
2.5. Tiermodell der TRIF defizienten Maus	23
2.6. Zielsetzung	24
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1. Material	25
3.1.1. Kits	25

Inhaltsverzeichnis

3.1.2.	Chemikalien und Reagenzien	26
3.1.3.	Puffer und Lösungen	27
3.1.4.	Real time Primer	31
3.1.5	Western Blot: Antikörper	32
3.1.6	Immunhistochemie: Antikörper.....	33
3.1.7	Zellkultur.....	34
3.1.8	Computersoftware	35
3.1.9	Statistik.....	35
3.2	Methoden.....	36
3.2.1	Mauslinie und Tierhaltung	36
3.2.2	Echokardiographie	39
3.2.3	Working Heart	41
3.2.4	Zellkulturtechniken/ In vitro-Analysen.....	44
3.2.5	RNA-Techniken.....	54
3.2.6	Proteintechniken	63
3.2.7	Histologie	68
4.	ERGEBNISSE	74
4.1.	Zeitliches Expressionsprofil MyD88-abhängiger und unabhängiger Zytokine nach Aortenligatur	74
4.2.	TRIF-Signalweg: Expression von TRIF und TRIF-abhängiger Gene 7 Tage nach Aortenligatur.....	75
4.3.	Bestimmung der myokardialen Hypertrophie	78
4.3.1.	Histologische Beurteilung des Myokards.....	79
4.3.2.	Expressionsbestimmung der molekularen Marker für kardiale Druckveränderungen.....	81
4.4.	Inflammatorische Zellinfiltration	83
4.4.1.	Einwanderung von CD3 ⁺ T-Lymphozyten	83
4.4.2.	Einwanderung von F4/80 ⁺ Makrophagen	85
4.5.	Expressionsanalyse von MyD88 – und TRIF-abhängiger Zytokine in linksventrikulärem Gewebe und in LPS-stimulierten Monozyten aus der Milz .	87
4.5.1.	Zytokinexpression 7 Tage nach Aortenligatur	87
4.5.2.	Zytokinexpression 35 Tage nach Aortenligatur	90
4.6.	Einfluss von TRIF auf die Entwicklung kardialer Fibrose	93
4.7.	Bedeutung des TGF-beta Signalwegs für die Entstehung TRIF-abhängiger Fibrose.....	97
4.8.	TGF-beta Expression im Myokard.....	98

Inhaltsverzeichnis

4.9. TGF-beta Expression in siRNA-transfizierten Zellen	100
4.10. Smad Signaling.....	101
4.11. Fibrose-assoziierte miRNAs	103
4.12. Nicht Smad assoziierter Signalweg	104
4.13. Aktivierung von Tumorsuppressorgenen	105
4.14. Einfluss von TRIF auf proliferatorische Eigenschaften	108
4.15. Funktionelle Beurteilung: Echokardiographie und Working Heart	109
4.15.1. Echokardiographie	109
4.15.2. Working Heart	111
5. DISKUSSION.....	113
5.1. Inflammation und Hypertrophie.....	113
5.2. Nachlasterhöhung steigert die Expression inflammatorischer Zytokine im Myokard nur zum frühen Zeitpunkt.....	114
5.3. Nachlast-induzierte Hypertrophie ist weitestgehend TRIF-unabhängig	115
5.4. Die Einwanderung von inflammatorischen Zellen ist zum frühen Zeitpunkt der Nachlasterhöhung TRIF-abhängig.....	116
5.5. TRIF hat lokal Einfluss auf die durch Nachlasterhöhung induzierte myokardiale Zytokinexpression	117
5.6. TRIF moduliert profibrotische Vorgänge im frühen Remodeling	118
5.7. Potentieller Signalweg für TRIF-abhängiges maladaptives Remodeling	119
5.7.1. TGF-beta und TGF-beta regulierte Signalwege werden durch den TRIF moduliert	119
5.7.2. Die Expression der antifibrotisch wirkenden miR-29 wird in TRIF-defizienten Mäusen positiv beeinflusst	122
5.8. Die Abwesenheit von TRIF fördert die Proliferation und hemmt die Apoptose	123
5.9. Das Fehlen von TRIF verlangsamt die Entstehung eines hypertrophen Phänotyps	125
5.10. Schlussfolgerung: TRIF-abhängige TGF-beta Expression und Fibrose moduliert nachlastabhängiges myokardiales Remodeling.....	127

Inhaltsverzeichnis

6. LITERATURVERZEICHNIS.....	129
7. PUBLIKATIONEN/DANK	136
7.1. Abstrakt-Publikationen.....	136
7.2. Original-Arbeiten	138
7.3. Danksagung	139
8. LEBENSLAUF	141

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MÖGLICHE KRITERIEN ZUR DIFFERENZIERUNG DER HYPERTROPHIE	6
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PATHOLOGISCHEN HYPERTROPHIE	8
ABBILDUNG 3: MORPHOLOGIE DER KARDIOMYOZYTEN BEI KARDIALER HYPERTROPHIE	9
ABBILDUNG 4: ÜBERSICHT INVOLVIERTER SIGNALWEGE BEI KARDIALER HYPERTROPHIE	12
ABBILDUNG 5: INTERFERON TYP I- UND TYP 2-SIGNALWEG.....	15
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EXOGENEN UND ENDOGENEN TLR- LIGANDEN	16
ABBILDUNG 7: AUFBAU DES TOLL-LIKE REZEPTORS	18
ABBILDUNG 8: DER MYD88-ABHÄNGIGE SIGNALWEG.....	20
ABBILDUNG 9: DER MYD88-UNABHÄNGIGE TRIF-SIGNALWEG.....	22
ABBILDUNG 10: M-MODE AUFZEICHNUNG	40
ABBILDUNG 11: AUFBAU DER WORKING HEART APPARATUR.....	42
ABBILDUNG 12: EIN IN DIE WORKING HEART ANLAGE EINGESpanNTES HERZ.....	44
ABBILDUNG 13: SDS-PAGE GRÖßENSTANDARDS.....	66
ABBILDUNG 14: DIE GENEXPRESSION VON MYD88-ABHÄNGIGEN UND –UNABHÄNGIGEN ZYTOKINEN IST ZU EINEM FRÜHEN ZEITPUNKT NACH NACHLASTERHÖHUNG IM MYOKARD AM HÖCHSTEN	75
ABBILDUNG 15: TRIF-DEFIZIENTE MÄUSE ZEIGEN EINE GERINGERE EXPRESSION VON TRIF, IRF3 UND INTERFERON BETA.....	77
ABBILDUNG 16: NACHLASTERHÖHUNG BEWIRKT EINE VERGLEICHBARE AUSPRÄGUNG MORPHOLOGISCHER HYPERTROPHIEMARKER IN BEIDEN TIERSTÄMMEN	78
ABBILDUNG 17: NACHLASTERHÖHUNG BEWIRKT VERGLEICHBARE VERÄNDERUNGEN DER KARDIOMYOZYTENGROßE IN BEIDEN TIERSTÄMMEN	80
ABBILDUNG 18: TRIF-DEFIZIENZ FÜHRT ZU VERZÖGERTEM EXPRESSIONSANSTIEG VON VASODILATORISCHEN BOTENSTOFFE NACH NACHLASTERHÖHUNG.....	82
ABBILDUNG 19:IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS VON CD3 ⁺ - ZELLEN IM MYOKARD	84
ABBILDUNG 20: IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS VON F4/80 ⁺ - ZELLEN IM MYOKARD ...	86
ABBILDUNG 21: TRIF BEEINFLUSST DIE EXPRESSION DER MYD88-ABHÄNGIGER ZYTOKINE IM MYOKARD AN TAG 7 NACH TRANSAORTALER KONSTRIKTION	89
ABBILDUNG 22: DIE ERHÖHUNG DER NACHLAST BEWIRKT EINEN ANSTIEG DER GENEXPRESSION TRIF-ABHÄNGIGER ZYTOKINE BEREITS AN TAG 7 NACH TRANSAORTALER KONSTRIKTION	90
ABBILDUNG 23: ANGLEICHUNG DER GENEXPRESSION DER MYD88-ABHÄNGIGEN ZYTOKINE AN TAG 35 NACH TRANSAORTALER KONSTRIKTION	92
ABBILDUNG 24: ANGLEICHUNG DER GENEXPRESSION DER TRIF-ABHÄNGIGEN ZYTOKINE AN TAG 35 NACH TRANSAORTALER KONSTRIKTION.....	93
ABBILDUNG 25: TRIF BEEINFLUSST DEN GRAD DER INTERSTITIELLEN FIBROSE	96
ABBILDUNG 26:GESTEIGERTE KOLLAGEN 1ALPHA GENEXPRESSION IN WILDPTYTIEREN....	97
ABBILDUNG 27:TRIF KNOCKOUT FÜHRT ZUR VERMINDERTER TGF-BETA PROTEINEXPRESSION	99
ABBILDUNG 28: TRIF KNOCK DOWN FÜHRT IN ALLEN ZELLTYPEN ZU EINER REDUKTION DER TGF-BETA PROTEINEXPRESSION	100
ABBILDUNG 29: TRIF BEEINFLUSST DIE MYOKARDIALE SMAD-EXPRESSION	102

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 30: ANTIFIBROTISCH WIRKENDE MIRNAS WERDEN NACH TRIF-DEFIZIENZ VERMEHRT PRODUZIERT	103
ABBILDUNG 31: TRIF HAT KEINEN NACHVOLLZIEHBAREN EINFLUSS AUF DIE AKTIVIERUNG DER PROTEINKINASE AKT	104
ABBILDUNG 32: TRIF-DEFIZIENZ VERHINDERT DIE AKTIVIERUNG PROAPOPTOTISCHER GENE	106
ABBILDUNG 33: TRIF KNOCK DOWN FÜHRT ZU GERINGERER EXPRESSION VON PROAPOPTOTISCHEN GENE	107
ABBILDUNG 34: TRIF KNOCK DOWN UNTERSTÜTZT DIE PROLIFERATION VON KARDIOMYOZYTEN UND HEMMT DIE PROLIFERATION VON FIBROBLASTEN.....	108
ABBILDUNG 35: ECHOKARDIOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER LINKSVENTRIKULÄREN WANDDICKE UND DER LINKSVENTRIKULÄREN MASSE	110
ABBILDUNG 36: MODULATION DER PROZENTUALEN AUSWURFFRAKTION (EJECTION FRACTION, EF, ECHOKARDIOGRAPHIE)	110
ABBILDUNG 37: MODULATION DER PROZENTUALEN AUSWURFFRAKTION (EJECTION FRACTION, EF; WORKING HEART)	112
ABBILDUNG 38: HERZAUSWURFLEISTUNG UND SCHLAGVOLUMEN IM WORKING HEART MODE	112
ABBILDUNG 39: MÖGLICHE TRIF-ABHÄNGIGE REGULATION BEIM MALADAPTIVEN REMODELING	128

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: KITS	25
TABELLE 2: CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	26
TABELLE 3: MURINE PRIMER	31
TABELLE 4: MURINE PRIMER, TAQMAN® MICRORNA ASSAY, LIFE TECHNOLOGIES/ APPLIED BIOSYSTEMS, DARMSTADT	32
TABELLE 5: WESTERN BLOT. PRIMÄRANTIKÖRPER. ZU DETEKTIERENDE PROTEINE, DEREN MOLEKULARGEWICHT (kDa), VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DEREN VERDÜNNUNG .	32
TABELLE 6: WESTERN BLOT. PEROXIDASE-GEKOPPELTE SEKUNDÄRANTIKÖRPER ZUR IMMUNDETEKTION. SPEZIES, VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DEREN VERDÜNNUNG ..	33
TABELLE 7: IMMUNHISTOCHEMIE. PRIMÄRANTIKÖRPER. ANTIGEN, VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DEREN VERDÜNNUNG.....	33
TABELLE 8: IMMUNHISTOCHEMIE. FLUORESCENZ-GEKOPPELTE SEKUNDÄRANTIKÖRPER. SPEZIES, VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DEREN VERDÜNNUNG	33
TABELLE 9: IMMUNHISTOCHEMIE. BIOTIN-GEKOPPELTE SEKUNDÄRANTIKÖRPER. SPEZIES, VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DEREN VERDÜNNUNG	33
TABELLE 10: FLEXI TUBE siRNA, QIAGEN, HILDEN.....	35
TABELLE 11: TRANSFEKTIONSANSATZ FÜR THP1-ZELLEN.....	50
TABELLE 12: TRANSFEKTIONSANSATZ FÜR HAOEC-ZELLEN	51
TABELLE 13: TRANSFEKTIONSANSATZ FÜR NEONATALE RATTEN-KARDIOMYOZYTEN	52
TABELLE 14: TRANSFEKTIONSANSATZ FÜR NEONATALE RATTEN-FIBROBLASTEN	53
TABELLE 15: ZUSAMMENSETZUNG EINES 20ML ANSATZES ZUR REVERSE TRANSKRIPTION VON mRNA	56
TABELLE 16: CYCLE-BEDINGUNGEN ZUR REVERSE TRANSKRIPTION DER mRNA.....	56
TABELLE 17: ZUSAMMENSETZUNG EINES 15ML ANSATZES ZUR REVERSE TRANSKRIPTION VON mRNA	57
TABELLE 18: CYCLE-BEDINGUNGEN ZUR REVERSE TRANSKRIPTION DER MICRORNA.....	57
TABELLE 19: ZUSAMMENSETZUNG EINES 20ML ANSATZES FÜR DIE SYBR GREEN REAL-TIME-PCR	59
TABELLE 20: CYCLE-BEDINGUNGEN FÜR DIE SYBR GREEN REAL-TIME-PCR	59
TABELLE 21: ZUSAMMENSETZUNG EINES 20ML ANSATZES FÜR DIE TAQMAN® REAL-TIME-PCR	60
TABELLE 22: CYCLE-BEDINGUNGEN FÜR DIE TAQMAN® REAL-TIME-PCR.....	61
TABELLE 23: ZUSAMMENSETZUNG DES TRENN- UND SAMMELGELS	65
TABELLE 24: FÄRBEPROTOKOLL DER HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	69
TABELLE 25: FÄRBEPROTOKOLL DER SIRIUS RED-FÄRBUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	70

Abkürzungen und Symbole

CASP	Caspase
EDD	Enddiastolischer Diameter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejection Fraction, Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
ESD	Endsystolischer Diameter
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS, FKS	Fetal Calf Serum, Fötales Kälberserum
FS	Fractional Shortening, Verkürzungsfraction
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{dest}	Destilliertes Wasser
HG	Quecksilber
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HS	Horseserum, Pferdeserum
Hz	Hertz
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
i.p.	Intraperitoneal
IVS,d	Enddiastolisches intraventrikuläres Septum
IVS,s	Endsystolisches intraventrikuläres Septum
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
ko	Knock out
l	Liter
LAD	Left anterior descendens artery, linke vordere absteigende Koronararterie
LV	Linksventrikulär, linker Ventrikel
m	Meter

Abkürzungen und Symbole

M	Molar
m-	Milli-
mA	Milliampere
MAP(K)	Mitogen-aktivierte Protein (-kinase)
miR	micro RNA
min	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
n-	Nano-
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	Neonatal Calf Serum, Neonatales Kälberserum
NF- κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated <i>B</i> -cells
ng	Nanogramm
NHE-1	Natrium-Protonen-Austauscher Isoform 1
nm	Nanometer
n.s.	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
OP	Operation
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PW	Posterior Wall, Hinterwand
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure

Abkürzungen und Symbole

rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RR	Respiration Rate, Atemfrequenz
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-time-PCR
S(ek)	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate, Natriumlaurylsulfat
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV	Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF-beta	Transforming growth factor β
TICAM-1	Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule-1
TNF-alpha	Tumor necrosis factor α
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	Vergleiche
Vol	Volumen
w/v	Weight/volume, Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
α -MHC	Myosin heavy chain isoform α
β -MHC	Myosin heavy chain isoform β
Δ	Delta, Differenz

Abkürzungen und Symbole

λ	Lambda, Wellenlänge
μ	Micro-
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

1. Zusammenfassung

Die kardiale Hypertrophie infolge einer chronischen Druck- bzw. Volumenüberbelastung ist häufig die Ursache für die Entstehung einer Herzinsuffizienz. Der kontinuierlichen Verlust der Kardiomyozytenfunktionalität, Zelltod und die Ersetzung der Kardiomyozyten durch interstitielle Fibrose kennzeichnet die Progression der Herzinsuffizienz. Maladaptives Remodeling geht mit vermehrter Inflammation einher, und es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von proinflammatorischen Zytokinen und nachlastinduzierter Hypertrophie und Fibrose. Dabei führt die intrazelluläre Signalübertragung vermittelt durch die Toll-like Rezeptor-abhängigen Adaptormoleküle MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) oder TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), zur Sezernierung proinflammatorischer Zytokine und zur Infiltration von inflammatorischen Zellen ins Myokard.

In der vorliegenden Arbeit konnte am etablierten murinen Tiermodell der transaortalen Konstriktion (TAC) gezeigt werden, dass eine vermehrte kardiale Druckbelastung bereits innerhalb weniger Stunden zu einem Anstieg von MyD88- und der TRIF-abhängigen Zytokinen im Herzen führt. Das Maximum der Zytokinexpression wird innerhalb der ersten Woche erreicht, um zum Zeitpunkt der manifestierten Hypertrophie wieder auf das Kontrollniveau zu sinken. Das Ausschalten des TRIF-Signalwegs hat zwar keinen Einfluss auf die kardiale Hypertrophie, aber die Einwanderung von inflammatorischen Zellen ins Myokard wird durch die Inhibition von TRIF vermindert. Weiterhin bewirkt eine TRIF-Defizienz im frühen Stadium des maladaptiven Remodelings lokal und peripher eine Reduktion der Genexpression von Transkriptionsfaktoren sowie TRIF-abhängigen Zytokinen. Über die Modulation von TGF-beta (Transforming growth factor beta)-Signaling und antifibrotischer microRNA ist der TRIF-Signalweg bei der Entstehung der interstitiellen Fibrose involviert. Neben einem geringeren Kollagengehalt vermindert das Fehlen von TRIF im frühen Stadium der Hypertrophie die Expression proapoptotischer Proteine wie p53 and p16 und der Bax/Bcl Ratio. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in vitro TRIF knock down die proliferatorischen Eigenschaften von Kardiomyozyten verbessert, aber bei

Zusammenfassung

Fibroblasten eine entgegengesetzte Wirkung induziert. Auf lange Sicht beeinflusst das Ausschalten von TRIF die pathologisch veränderte Funktionalität des Herzens wenig, wenngleich die Zunahme der linksventrikulären Wanddicke und Masse verlangsamt und die Auswurfraction (EF) länger auf dem Normalniveau bleibt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nachlastinduzierte linksventrikuläre Hypertrophie nicht TRIF-abhängig ist, TRIF aber im frühen Stadium des kardialen Remodelings die vermehrte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine sowie die Einwanderung inflammatorischer Zellen induziert. Mit dieser Arbeit konnte belegt werden, dass der TRIF Signalweg bei der Entstehung der nachlastinduzierten kardialen Fibrose involviert ist und dabei an unterschiedlichsten Stellen der Signalweiterleitung regulierend einwirkt.

1. Summary

Pressure or volume overload induced cardiac hypertrophy represents an essential cause for the development of heart failure. Continuous functional loss of cardiomyocytes, cell death and the replacement of cardiomyocytes by interstitial fibrosis characterizes the progression of heart failure. Maladaptive cardiac remodeling is associated with increased inflammation. In hypertrophic hearts, a correlation between the presence of pro-inflammatory cytokines and hypertrophy and fibrosis is evident. Intracellular signal transduction mediated by the Toll-like receptor-dependent adapter molecules MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) or TRIF (TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β) leads to the secretion of these proinflammatory cytokines and triggers the infiltration of inflammatory cells into the myocardium.

The present study performed on the established murine model of transaortic constriction (TAC), reveals that increased cardiac pressure overload immediately leads to an increase of MyD88- and TRIF-dependent cytokines in the heart. The maximum expression level of cytokines is detected within the first week and decreases to their control level when the hypertrophic stage is manifested. Inhibition of the TRIF pathway has no effect on cardiomyocyte hypertrophy. However, migration of inflammatory cells into the myocardium is reduced by the inhibition of TRIF. Furthermore, in the early stage of hypertrophy, TRIF deficiency causes a reduction of locally and peripherally expressed transcription factors and TRIF-dependent cytokines. Through the modulation of the TGF-beta signaling pathway and antifibrotic microRNAs, TRIF signaling is involved in the development of interstitial fibrosis. In addition to less cardiac collagen content, the absence of TRIF effects a decreased expression of proapoptotic proteins such as p53 and p16 and the Bax/Bcl Ratio in the early stage of hypertrophy. This work's in vitro data emphasized that the inhibition of TRIF improves proliferation of cardiomyocytes but inhibits fibroblasts proliferation. While there are only little long term effects on cardiac function following TRIF deficiency, left ventricular wall thickening, increase in myocardial hypertrophy and reduction of ejection fraction is slowed down compared to control animals.

Summary

As the present work shows, pressure overload induced left ventricular hypertrophy is not TRIF-dependent. However, TRIF induces an increased release of inflammatory cytokines as well as the immigration of inflammatory cells in the early stage of cardiac maladaptive remodeling. The TRIF pathway- as the main conclusion of this work- is involved in the development of cardiac fibrosis with a modulating effect at several points of the inflammatory and fibrotic signal transduction pathway.

2. Einleitung

2.1. Kardiale Hypertrophie

Das Herz ist ein Hohlmuskel. Es besteht aus vier Kammern, die über Herzklappen miteinander verbunden sind. Dabei wird in den beiden Atrien das Blut gesammelt und aus den beiden Ventrikeln wird das Blut in den Lungen- oder Körperkreislauf gepumpt. Da die linke Herzhälfte mit weit mehr Druck als die rechte Herzhälfte pumpen muss, besitzt diese deutlich mehr Muskelmasse.

Auch wenn das Herz ein Muskel ist, besteht es nicht nur aus Herzmuskelzellen, den Kardiomyozyten, die mit 70-80% den Hauptanteil der myokardialen Masse ausmachen. Daneben finden sich im Myokard Fibroblasten, Endothelzellen, Mastzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen und eine umgebende extrazelluläre Matrix (LIN et al., 2014). Diese Geometrie des Herzens ist nicht statisch. Die strukturelle Homogenität des Herzens wird durch ein balanciertes Äquilibrium zwischen stimulatorischen und inhibitorischen Signalen gewährleistet, die unter anderem Zellwachstum / Zelltod wie auch Phänotyp und metabolische Prozesse beeinflussen (WEBER, 2000). Dadurch ist das Herz in der Lage sich funktionellen Beanspruchungen anzupassen.

Die Vergrößerung der Herzmasse als Kompensationsreaktion des Herzens auf einen erhöhten Leistungsbedarf des Herz-Kreislaufsystems bezeichnet man als myokardiale Hypertrophie. Die Hypertrophie ist primär eine Folge des Kardiomyozytenwachstums. Da Kardiomyozyten kaum Proliferationskapazität besitzen, können sie primär nur mit einer Zellvergrößerung auf die veränderten Verhältnisse antworten.

Die Hypertrophie kann in Folge von erhöhter körperlicher Leistung entstehen (adaptives Remodeling, physiologische Hypertrophie). In den meisten Fällen liegt aber als Auslöser eine pathologisch verursachte Mehrbelastung (Druck-Volumen-Stress) vor (maladaptives Remodeling, pathologische Hypertrophie). Ein einfaches Schema zur Klassifizierung der kardialen Hypertrophie zeigt die Abbildung von Dorn et al. (DORN et al., 2003). So scheinen auch unterschiedliche Signalwege für maladaptive und physiologische Hypertrophie verantwortlich zu sein. Die Aufklärung, an welcher Stelle der „Schalter“ zwischen adaptiv und maladaptiv ungelegt wird, stellt

einen wichtigen Ansatzpunkt zur Behandlung der pathologischen Hypertrophie dar (FREY et al., 2004).

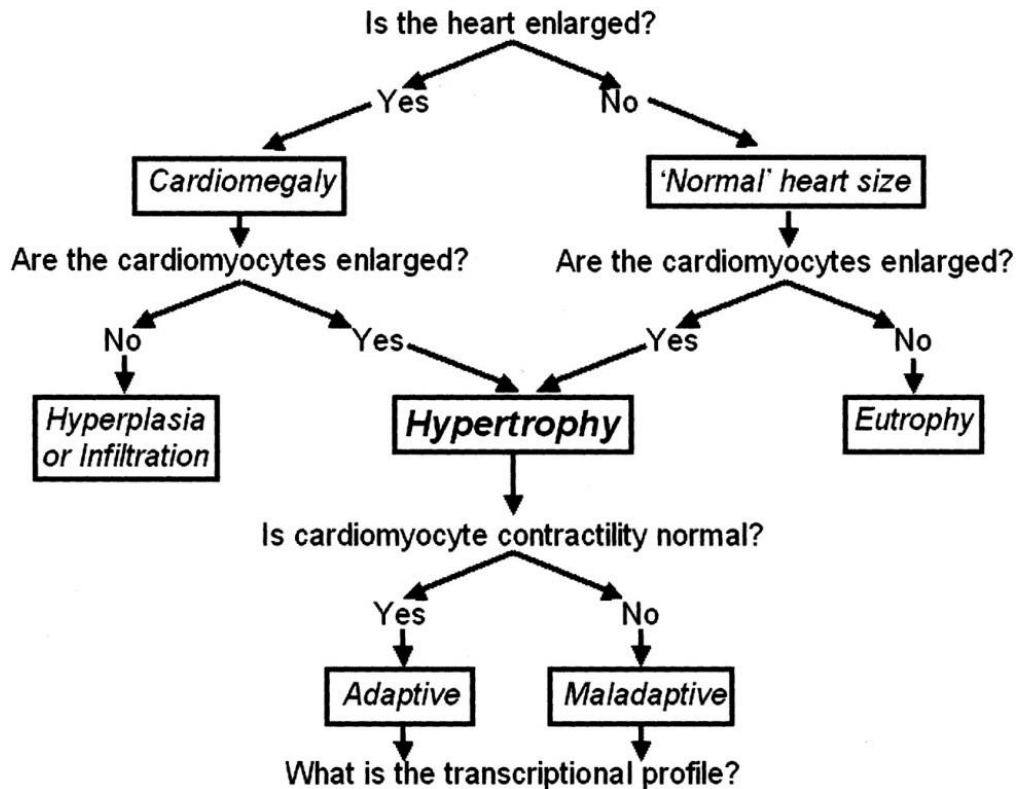


Abbildung 1: Mögliche Kriterien zur Differenzierung der Hypertrophie (DORN et al., 2003) mit Erlaubnis

2.1.1. Physiologische Hypertrophie

Die Hypertrophie des Herzen muss nicht immer ein maladaptiver Prozess sein. Sie kann sich auch adaptiv auswirken, wie z.B. bei Ausdauersportlern. Diese Art der nicht-pathologischen Hypertrophie wird deshalb auch als „Sportlerherz“ bezeichnet (ROST, 1997). Stimulus sind gesteigerte körperliche Aktivität oder Leistungssport. Die durch den Ausdauersport induzierte physiologische Hypertrophie wirkt sich eher prognostisch positiv aus und führt zu einer Verbesserung der Herzfunktion (WIDMER et al., 2014). Ein Sportlerherz unterscheidet sich in seiner Morphologie von einem pathologisch vergrößerten Herzen. Das Herz weist neben einem vergrößerten Kammervolumen eine proportional erhöhte Wanddicke auf. Neben geringerer Akkumulation von Kollagen bleibt auch die Verdickung des Myokards moderat. Diese

Hypertrophie ist in der Regel nicht mit Herzinsuffizienz oder erhöhter Mortalität assoziiert und ist reversibel.

2.1.2. Pathologische Hypertrophie

Eine pathologische Hypertrophie entsteht aufgrund eines pathologischen Stimulus, der zu einer Druck- oder Volumenüberbelastung führt.

Eine pathologische Hypertrophie kann beide Ventrikel des Herzens betreffen. Die rechtsventrikuläre Hypertrophie wird durch erhöhte Widerstände im kleinen Blutkreislauf (Lungenkreislauf) hervorgerufen. Ursache dafür kann eine Mitralklappeninsuffizienz oder –stenose sein. Ebenso können Lungenemphyseme oder eine indurierende Pneumonie, die alle zu einer pulmonalen Hypertonie führen, eine Rechtsherzhypertrophie induzieren (Cor Pulmonale).

Weit häufiger als die Rechtsherzhypertrophie tritt die Linksherzhypertrophie auf. Hier sind pathophysiologischen Veränderungen wie eine Aortenstenose oder arterielle Hypertonie die Ursachen. Als kompensatorische Antwort auf diesen hämodynamischen Stress beginnt das Herz zu hypertrophieren. Aufgrund der unterschiedlichen Auslöser unterscheidet man zwei Hypertrophie-Typen. Die exzentrische Hypertrophie entsteht aufgrund von erhöhter Volumenbelastung (z.B. Mitralklappeninsuffizienz) und führt zu einer Ventrikeldilatation. Chronische Druckbelastung (z.B. Hypertonie) führt zu einer konzentrischen Hypertrophie. Die Dickenzunahme erfolgt nach innen, was eine Verkleinerung des Ventrikellumens zur Folge hat.

Die pathologische Hypertrophie ist assoziiert mit Herzinsuffizienz und einer erhöhten Mortalität und ist nur bedingt reversibel (LEVY et al., 1990).

2.2. Einfluss der pathologischen Hypertrophie auf die kardiale Architektur

Die veränderten Druck- und Volumenbedingungen aufgrund hämodynamischen Stresses wirken sich sowohl auf die Zusammensetzung des kardialen Gewebes als auch auf die Struktur der involvierten Zelltypen aus. Bei kardialen Remodelingprozessen sind Kardiomyozyten, kardiale Fibroblasten, das Koronargefäßsystem sowie die extrazelluläre Matrix (EZM) involviert.

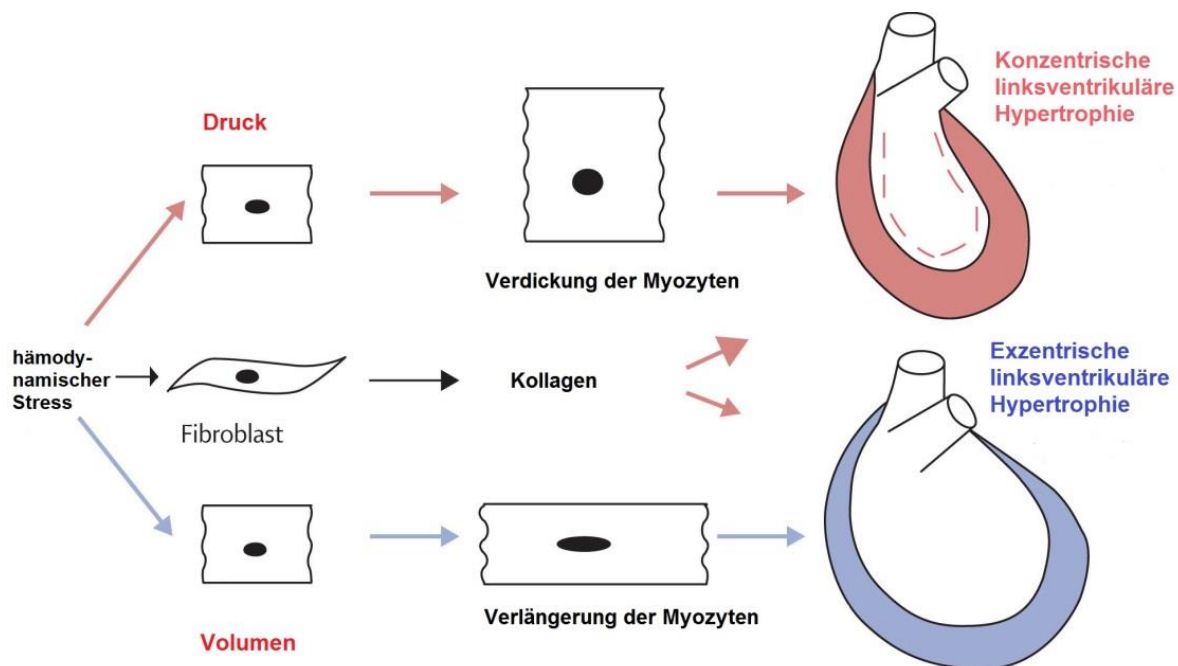


Abbildung 2: Schematische Darstellung der pathologischen Hypertrophie

Konzentrische Hypertrophie (rot): Durch chronisch erhöhte Druckbelastung wird eine Verdickung der Myozyten induziert und es kommt zu einer Verdickung der Herzwand nach innen (gestrichelte Linie). Exzentrische Hypertrophie (blau): Eine chronisch erhöhte Volumenbelastung bewirkt ein Längenwachstum der Myozyten und der Ventrikel dilatiert. Modifiziert nach (OPIE et al., 2006)

2.2.1. Remodeling der Kardiomyozyten

Bei der exzentrischen Hypertrophie ist makroskopisch der linke Ventrikel dilatiert und weist eine Dickenvergrößerung nach außen auf. Hierbei sind die Sarkomere in Serie addiert und die Kardiomyozyten zeigen ein longitudinales Wachstum (FREY et al., 2004). Eine verminderte Kontraktilität des Herzmuskels ist die Folge.

Die konzentrische Hypertrophie ist durch eine Dickenzunahme der Ventrikelwand nach innen sowie einer Verdickung des Septums gekennzeichnet. Dies führt zu einer Verminderung des Ventrikellumens. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer

Einleitung

parallelen Addition der Sarkomere und somit zu einem lateralen Wachstum der Kardiomyozyten (FREY et al., 2004). Damit steigt zwar die Kraftentwicklung, gleichzeitig resultiert daraus aber ein vermindertes Kammervolumen.

Pathologische Bedingungen führen nicht nur zu einer veränderten Architektur der Kardiomyozyten sondern aufgrund einer Gleichgewichtsverschiebung der Wachstumsstimuli zu vermehrter Apoptose und Nekrose der Kardiomyozyten (BUJA, VELA, 2008; CHIEN, 1999; HUNTER, CHIEN, 1999).

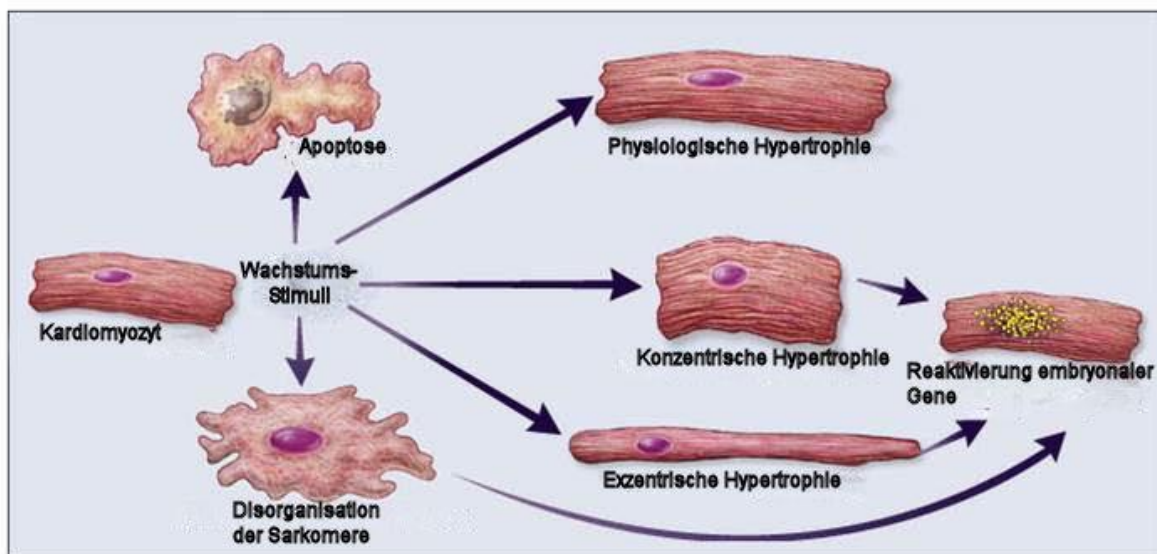


Abbildung 3: Morphologie der Kardiomyozyten bei kardialer Hypertrophie

Ausgeprägte phänotypische Veränderungen der Kardiomyozytenmorphologie werden durch verschiedenste Wachstumsstimuli verursacht. Myofibrilläre Unordnung (Disorganisation der Sarkomere) ist typisch für Kardiomyopathien und mit dem Kardiomyozytenwachstum assoziiert. Die Expression fetaler Gene ist ein Kennzeichen der pathologischen Hypertrophie. Modifiziert nach (HUNTER, CHIEN, 1999)

2.2.2. Aktivierung fetaler Gene im Zuge der Hypertrophie

Die Expression fetaler Gene ist in adulten Kardiomyozyten herabreguliert. Durch gesteigerten hämodynamischen Stress werden eine Vielzahl von Genen, die für die kardialen Kontraktilität und den Calciumhaushalt mitverantwortlich sind, wieder reaktiviert (BEISVAG et al., 2009; BEISVAG et al., 2006; STANTON et al., 2000). Als Antwort auf erhöhte Druckbelastung erfolgt zum Beispiel eine Reaktivierung von BNP (Brain Natriuretisches Peptid) und ANP (Atriales Natriuretisches Peptid) im Ventrikel.

2.2.3. Remodeling der extrazellulären Matrix

Kardiale Hypertrophie geht neben dem Kardyomyztenremodeling mit einer kontinuierlichen Veränderung der extrazellulären Matrix (EZM) einher. Die EZM umgibt und verankert als dreidimensionales Netzwerk die Kardiomyozyten und Fibrozyten. Neben dem struktuvermittelnden Faseranteil aus Kollagen (vorrangig Kollagen Typ I und Typ III) und Elastin besteht die extrazelluläre Matrix aus Basalmembranbestandteilen (Kollagen Typ IV, Laminin), Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen sowie biologisch aktiven Signalproteinen (HSUEH et al., 1998; SPINALE, 2002). Diese sehr komplexe Struktur der extrazellulären Matrix ist hinsichtlich Synthese und Degradation ausgezeichnet reguliert (PAUSCHINGER et al., 2002). So wird die Kollagensynthese kardialer Fibroblasten auf zellulärer Ebene gesteuert. Die Degradation der Matrixbestandteile wird wiederum durch das Gleichgewicht zwischen Matrix-Metalloproteasen (MMP), die Kollagene degradieren, und anderen Matrixkomponenten und Proteinen, die entweder die MMPs inhibieren (TIMP) oder die MMP-Aktivierung verhindern, in Schach gehalten (HUTCHINSON et al., 2010). Der hauptsächliche Syntheseort der MMPs sind infiltrierende Entzündungszellen und hier im Wesentlichen die Makrophagen.

Unter normalen Bedingungen ist die Synthese- und Abbaurate der Kollagene niedrig. Liegen pathologische veränderte Bedingungen vor, kommt es zu einer Steigerung der Kollagensynthese. Unter anderem durch erhöhte Expression von TGF-beta (Transforming Growth Factor) und CTGF (Connective Tissue Growth Factor) erfolgt eine Aktivierung der Kollagensynthese durch Fibroblasten. Dies führt zur Verdickung der linksventrikulären Wände sowie zu kardialer Fibrose (HEIN et al., 2003; KUWAHARA et al., 2004). Durch die Kollageneinlagerungen nimmt die Rigidität des Myokards zu und die Umstrukturierung der EZM bewirkt veränderte elektrophysiologischen Eigenschaften (BOWERS et al., 2010; MATSUBARA et al., 2000), was schließlich in myokardialer Dysfunktion mündet.

2.3. Signalwege der pathologischen Hypertrophie

Die hämodynamische Überbelastung der Kardiomyozyten verursacht nicht nur mechanischen Stress, sondern induziert auch die Aktivierung von Mechanorezeptoren, die Freisetzung systemischer und/oder lokaler Neurotransmitter, vasoaktiver Peptide sowie inflammatorischer Zytokine. Angiotensin II (ANG II), Endothelin (ET-1), Phenylephrin (PE), insulin-like growth factor 1 (IGF1), TGF- β und Cardiotrophin binden an membranständigen Rezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Rezeptortyrosinkinasen, Zytokinrezeptoren) (FREY, OLSON, 2003). Die Folge ist die Aktivierung von intrazellulären Signalwegskaskaden. Diese Signalwege umfassen unter anderem spezifische G-Protein Isoformen, leichte GTPasen (Ras, RhoA, Rac), Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), Proteinkinase C, Calcineurin, Insulin-like growth factor I (Igf1), Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (TGF-beta) (MOLKENTIN, DORN, 2001). Zu den wichtigsten Signalwegen gehören der Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K-p110 γ)/AKT und der Calcineurin Signaltransduktionsweg. Die unterschiedlichen Signalwege interagieren miteinander bzw. beeinflussen sich gegenseitig (FREY, OLSON, 2003; SUGDEN, 2001), was zu einer Signalamplifikation und –modulation führt.

Durch die Signalwege und deren Interaktionen werden letztendlich extrazelluläre Signale an den Zellkern übermittelt und die Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren bewirkt. Deren Bindung an Promoter- bzw. Enhancer-Regionen beeinflusst die Modulation der Expression einer Vielzahl von Genen und die Reexpression des fetalen Genprogramms und führt letztendlich zum pathologischen Phänotyp der Kardiomyozyten (SADOSHIMA, IZUMO, 1997).

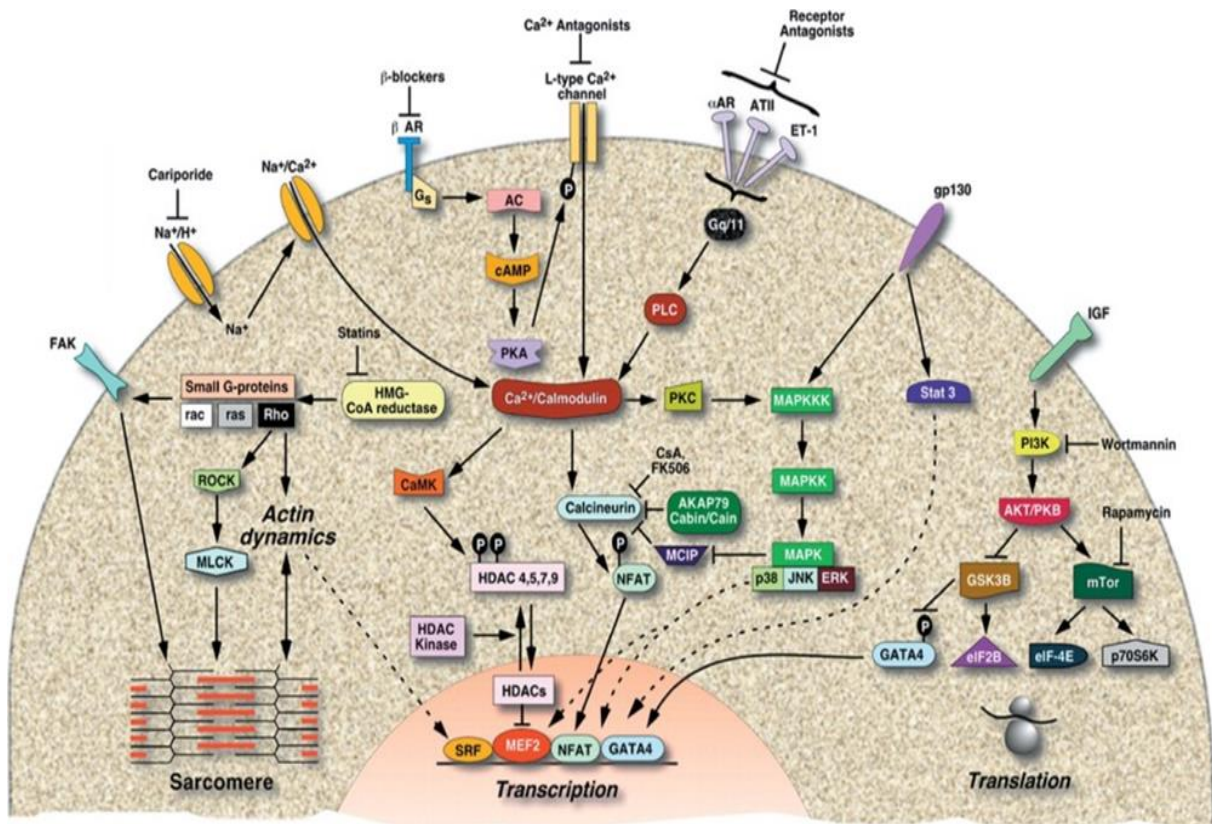


Abbildung 4: Übersicht involvierter Signalwege bei kardialer Hypertrophie (FREY, OLSON, 2003) mit Erlaubnis

2.4. Inflammation und Hypertrophie

Inflammatorische Prozesse spielen bei der Pathogenese kardialer Erkrankungen wie Endokarditis, Myokarditis und Perikarditis eine wichtige Rolle (BEN-HAIM et al., 2009). Entzündungsprozesse sind nicht nur primäre Auslöser einer Herzinsuffizienz, sondern können auch maßgeblich an der Krankheitsprogression beteiligt sein bzw. als adaptive Reaktionen den Krankheitsprozesses modulieren. (KINDERMANN et al., 2008; PACKARD et al., 2009).

2.4.1. Zytokine

Proinflammatorische Zytokine rückten ins Zentrum der Herzforschung, nachdem ihre Bedeutung für die kardiale Regulation und Funktion und auch für die Herzinsuffizienz beschrieben wurde. (LEVINE et al., 1990). Dabei lag das Augenmerk primär auf der Nutzung dieser zirkulierender inflammatorischer Mediatoren als Biomarker für die Krankheitsprogression (RAUCHHAUS et al., 2000; SETA et al., 1996). So wurde gezeigt, dass ein erhöhter Plasmaspiegel von Zytokinen wie zirkulierendem TNF-alpha (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) und IL6 (Interleukin 6) mit einer schlechteren Prognose für die Herzinsuffizienz einhergeht. So korreliert der TNF-alpha-Level direkt mit der NYHA Klassifizierung (TORRE-AMIONE et al., 1996). Benedict et al. zeigte, dass Zytokine früher aktiviert werden als die klassischen neurohumoralen Faktoren, wie z.B. Angiotensin (BENEDICT et al., 1993). Die traditionelle Meinung, dass proinflammatorische Zytokine allein von Zellen des Immunsystems gebildet und somit primär für die Mediation der inflammatorischen Antworten der Gewebe seien, wurde inzwischen widerlegt. Heute weiß man, dass inflammatorische Mediatoren von allen kernhaltigen Zellen im Herzen gebildet werden können, also auch von Kardiomyozyten. Dies legt die Vermutung nahe, dass den Zytokinen mehr als nur die reine Modulation der Immunantwort zukommt (KAPADIA et al., 1995). So beeinflussen Zytokine das kardiale Remodeling über Veränderungen in der EZM durch Modulation der MMP- und TIMP-Aktivität (MANN, 2002). Seta et al. (SETA et al., 1996) postulierten, dass Zytokine hämodynamische Abnormalitäten verschlimmern bzw. direkt toxischen Effekte auf das Herz ausüben und direkt mit verschiedenen Krankheitsbildern der Herzinsuffizienz (u.a. linksventrikuläre Dysfunktion, endotheliale Dysfunktion oder Kardiomyopathie) in Verbindung gebracht werden können.

2.4.2. Interferone

Eine Untergruppe der Zytokine stellen die Interferone dar. Diese Glykoproteine sind an der Modulation der antiviralen und antitumoralen Immunantwort beteiligt und werden von einer Vielzahl von Zellen gebildet. Die Interferone werden in 3 Hauptklassen unterteilt: Interferon α (IFN- α , Leukozyten-Interferon), Interferon β (IFN- β , Fibroblasten-Interferon) und Interferon γ (IFN- γ , Immun-Interferon) (STEWART, 1980). Die Interferone wurden damals aufgrund ihrer immunologischen

Einleitung

und biochemischen Charakteristika als Typ 1- bzw. Typ 2-Interferone zusammengefasst. Diese Einteilung hat auch heute noch Gültigkeit. Inzwischen gehören zu den Typ 1-Interferonen neben den beiden wichtigsten Vertretern IFN- α und IFN- β insgesamt 13 Subtypen von IFN- α , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- τ , IFN- κ , und IFN- ω , IFN- λ und IFN- ζ (CHEN et al., 2004; PESTKA et al., 2004). IFN- γ ist dagegen bis heute der einzige beschriebene Vertreter der Typ 2 Interferone. Die Signalkaskade der beiden Interferontypen ist vergleichbar. Sie läuft über den JAK/STAT (Januskinase/ Signal transducers and activators of transcription) Signalweg, der durch Bindung von IFN- α und - β an den Typ 1 Interferonrezeptor-Komplex (IFNAR) bzw. den Interferonrezeptor γ -Komplex (IFNGR) aktiviert wird. Die Struktur der beiden Rezeptoren ist ebenfalls sehr ähnlich. Beide Rezeptortypen bestehen aus zwei Untereinheiten. So besteht der Interferon Typ 1-Rezeptor aus den Untereinheiten Interferon α Rezeptor 1 (IFNAR1) und Interferon α Rezeptor 2 (IFNAR2) (DE WEERD et al., 2007), der Typ 2-Rezeptor entsprechend aus Interferon γ Rezeptor 1 (IFNGR1) und Interferon γ Rezeptor 2 (IFNGR2). Da die IFN-Rezeptoren über keine intrinsische Kinaseaktivität verfügen, um Signalmoleküle (STATs) zu phosphorylieren, assoziieren sie mit JAKs über die IFNR-Untereinheiten IFNAR2, IFNGR1 und IFNGR2 oder mit Tyrosinkinase 2 (Tyk2), die mit der IFNAR1 Untereinheit interagiert (PLATANIAS, 2005). Dieser Signalweg führt nach Translokation der aktivierten STATs in den Zellkern zur Transkription unterschiedlicher Gene.

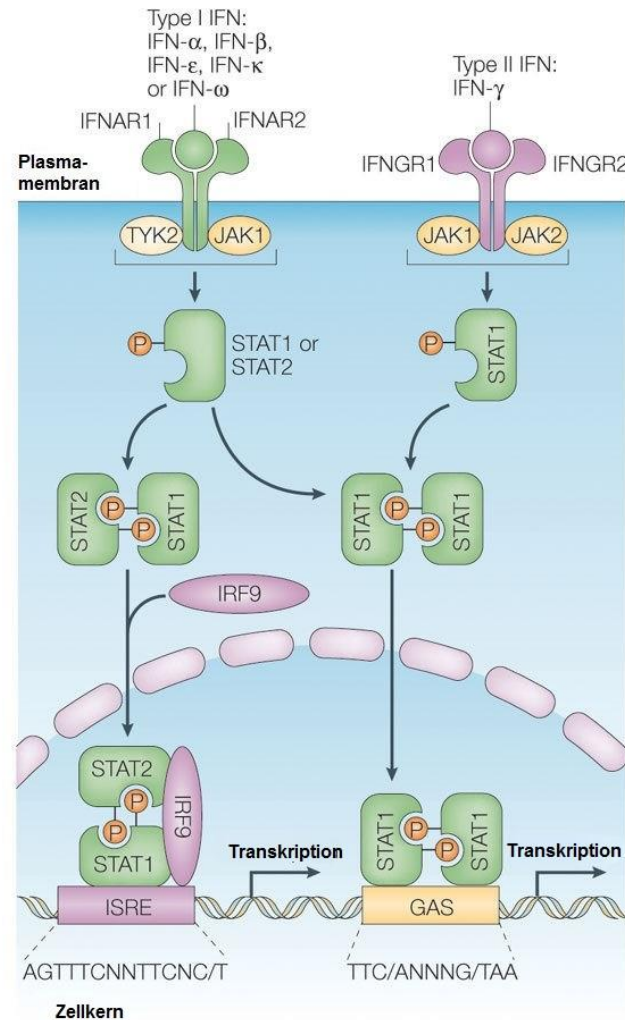


Abbildung 5: Interferon Typ I- und Typ 2-Signalweg

Alle Typ 1 Interferone (IFN) binden an einen gemeinsamen Oberflächenrezeptor, dem Interferon Typ 1 Rezeptor (IFNAR). IFN- γ (Typ 2 IFN) bindet als einziger Ligand an den Interferon Typ 2 Rezeptor. Die Rezeptoren sind mit JAKs (Januskinasen) bzw. TYK2 (Tyrosinkinase 2) assoziiert, die zur Phosphorylierung der Signalproteine benötigt werden und STAT 1 und 2 aktivieren. Diese Aktivierung induziert die Bildung des STAT1/STAT2/IRF9 (IFN-regulatory factor 9)-Komplexes (ISG3, IFN-stimulated gene (ISG) factor 3) und des STAT1/STAT1-Homodimers. Die Komplexe translokieren in den Zellkern, wo ISG3 an ISREs (IFN-stimulated response elements) und der STAT1/STAT1-Homodimer an GAS (IFN- γ -activated sites) binden und die Transkription unterschiedlichster IFN-stimulierter Gene bewirken. Modifiziert nach (PLATANIAS, 2005)

2.4.3. Toll-like Rezeptoren

Der Expression proinflammatorischer Proteine geht die Aktivierung einer Signalkaskade voraus, die durch die Erkennung von inflammatorischer Liganden durch membranständige Rezeptoren in Gang gesetzt wird. So sind die Toll-like Rezeptoren ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Sie gehören zur Gruppe der PRRs (pattern-recognition receptors) und dienen der Erkennung von konservierten pathogen-assoziierten molekularen Mustern und induzieren die primäre Auslösung einer Immunantwort wie der Aktivierung von Zytokinen und Interferonen. Ihr Name leitet sich von dem bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckten Rezeptor Toll ab, zu dem sie eine strukturelle und funktionelle Homologie aufweisen. Dieser Rezeptor wurde ursprünglich im Zusammenhang mit seiner Bedeutung für die dorso-ventrale Strukturierung in deren Embryonalentwicklung beschrieben (HASHIMOTO et al., 1988; LEMAITRE et al., 1996).

Bisher wurden 13 TLR-Paraloge identifiziert (im Menschen 10, in der Maus 12) (BEUTLER, 2004). TLRs erkennen körperfremde mikrobiologische Komponenten bakterieller, viraler oder pilzstämmiger Herkunft, aber auch TLRs endogene Liganden und sind somit auch bei inflammatorischen Prozessen involviert. Die Rezeptoren erkennen dabei Material, das bei Zellschädigungen oder –tod entsteht, sogenannte damage-associate molecular patterns (DAMPs) (GALLUCCI, MATZINGER, 2001; IONITA et al., 2010).

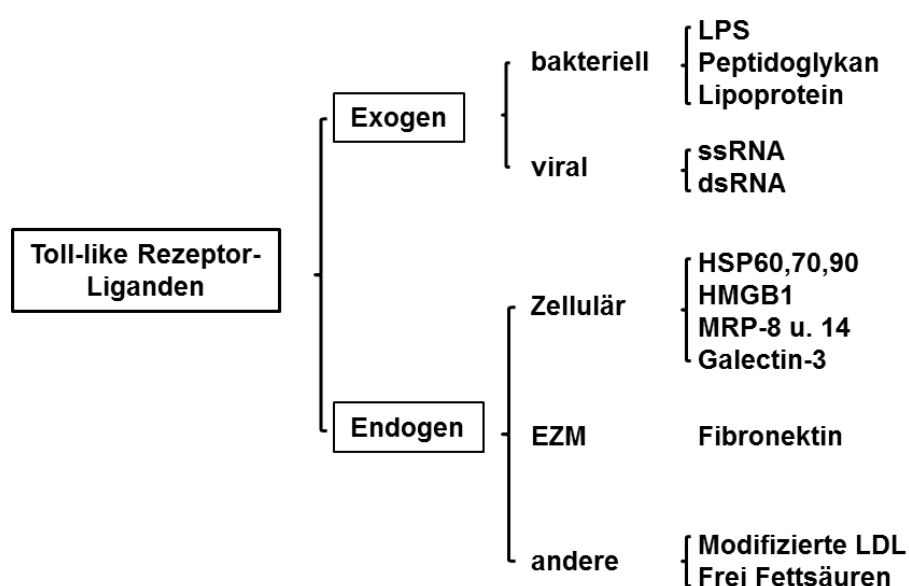


Abbildung 6: Schematische Darstellung der exogenen und endogenen TLR-Liganden
Modifiziert nach (IONITA et al., 2010)

Einleitung

Der erste beschriebene (in *Drosophila melanogaster*) und aufgrund der Signaltransduktion des Liganden LPS (Lipopolysaccharid) essentielle Rezeptor ist TLR4 (POLTORAK et al., 1998).

Die Expression der TLRs unterscheidet sich von Gewebe zu Gewebe. So ist auch im menschlichen Herz die mRNA-Expression von TLR 1 bis 10 unterschiedlich ausgeprägt. Der Expressionslevel von TLR 2, 3 und 4 ist annähernd 10mal höher als die von TLR 1, 5 und 10 (NISHIMURA, NAITO, 2005).

Toll-like Rezeptoren gehören zu den Typ 1-Transmembranproteinen. Der extrazelluläre Bestandteil der TLRs besteht aus einer n-terminalen leucinreichen LRR (Leucin rich repeats) Sequenz, die aus 19 - 25 Tandem-Kopien besteht, und einem intrazellulären Signal-Motiv, welches der Struktur von Interleukin 1 ähnelt und deshalb als TIR-Domain (Toll/IL-1 homology domain) bezeichnet wird. Die Toll-like Rezeptoren 1 - 6 sind auf der Zellmembran lokalisiert, während TLR 3 ,7 und 9 im intrazellulären Kompartiment primär von Endosomen und vom Endoplasmatischen Reticulum exprimiert werden, wobei die Ligandenbindungs-Domäne ins Lumen des Vesikels gerichtet ist (KAWAI, AKIRA, 2010; MANN, 2011).

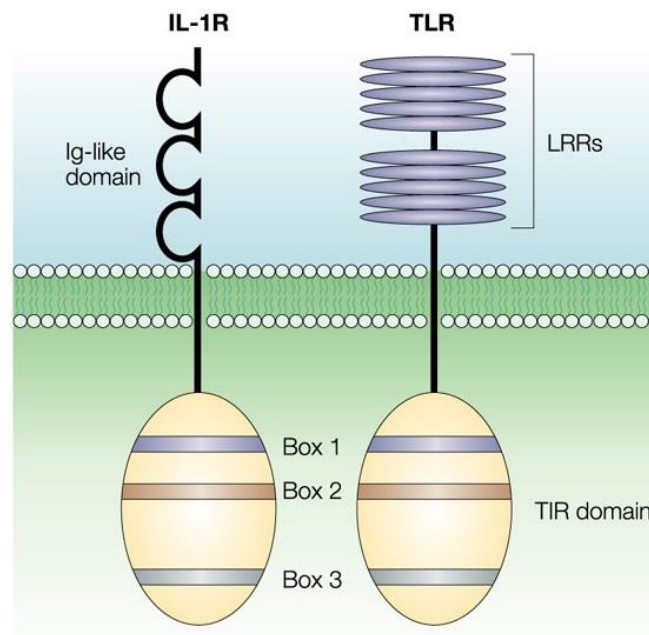


Abbildung 7: Aufbau des Toll-like Rezeptors

Die intrazelluläre Struktur des IL-1 Rezeptors (IL-1R) und die der Toll-like Rezeptoren (TLR) sind ähnlich. Beide besitzen eine konservierte zytoplasmatische Domäne. Angelehnt an den IL-1R wird dieser Teil der TLRs als *TIR domain* bezeichnet. Die TIR-Domäne besteht aus drei hoch homologen Regionen (= Box 1,2,3). Der extrazelluläre Bestandteil der TLRs hat Tandem-Repeats aus Leucin-reichen Sequenzen (leucin rich repeats, LRR). Modifiziert nach (AKIRA, TAKEDA, 2004)

Die Ligandenbindung bewirkt eine Dimerisierung und einen Konformationswechsel der TLRs, was zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalmoleküle führt. Wenn es auch extrazellulär eine Vielzahl von TLR-Liganden gibt, so sind den zehn Toll-like Rezeptoren zur intrazellulären Signaltransduktion nur vier Adaptorproteine nachgeschaltet: MyD88 (myeloid differentiation factor 88), MAL/TIRAP (Myd88-adaptor-like/TIR-associated protein), TRIF (Toll-receptor-associated activator of interferon, auch als TIR-domain-containing molecule 1, TICAM1 bezeichnet) und TRAM (Toll-receptor associated molecule, auch als TIR-domain-containing molecule 2, TICAM2 bezeichnet).

2.4.4. Toll-like Rezeptor Signaling

Für das Anschalten der inflammatorischen Zytokinproduktion ist MyD88 essentiell. Nach Ligandenbindung aktiviert MyD88 alle TLRs, außer TLR3. MyD88-unabhängig führt die Stimulation von TIRAP/MAL über TLR3- und TLR4 ebenfalls zur Produktion inflammatorischer Zytokine. Bindet der Ligand Poly I:C an TLR3 wird die intrazelluläre Signaltransduktion, die zur Aktivierung von Typ 1-Interferonen führt, angeschaltet. Dieser Signalweg ist MyD88-unabhängig und wird alleine von TRIF induziert. Auch die Stimulation von TLR4 führt zur Interferoninduktion. Somit nimmt TLR4 eine Sonderstellung innerhalb der Toll-like Rezeptoren ein, weil seine Aktivierung durch seinen Liganden LPS sowohl den MyD88-abhängigen als auch – unabhängigen Signalweg anschaltet.

2.4.5. MyD88- und TIRAP- Signalkaskade

Sowohl MyD88 als auch TIRAP setzen eine Signalkaskade in Gang, die die Expression inflammatorischer Zytokine bewirkt. Die Bindung von MyD88 oder TIRAP an TLRs löst die Phosphorylierung von IRAK4 (IL-1R-associated kinase 4) aus, was wiederum zur Phosphorylierung der assoziierten IRAK1 führt. Dadurch bindet TRAF6 (tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor 6) und der Komplex aus phosphorylierter IRAK1 und TRAF dissoziiert von IRAK4, um an der Plasmamembran mit TAK1(transforming-growth-factor- β -activated kinase 1), TAB1 (TAK1-binding protein 1) und TAB2 zu assoziieren. Das hat die Phosphorylierung von TAB1 und TAB2 sowie die Degradierung von IRAK1 zur Folge. Der übrige Komplex aus TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2 transloziert in das Zytosol und assoziiert dort mit den Ubiquitin-Ligasen UBC13 (ubiquitin-conjugating enzyme 13) und UEV1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1). TRAF6 wird nun ubiquitinyliert und dadurch wird TAK1 aktiviert. TAK1 wiederum phosphoryliert anschließend MAP-Kinasen (mitogen-activated protein Kinase) und den IKK-Komplex (inhibitor of nuclear factor- κ B-kinase complex). Der IKK-Komplex setzt sich aus IKK- α (IKK1), IKK- β (IKK2) und IKK- γ (nuclear factor - κ B, NF- κ B). Die Phosphorylierung dieses Komplexes führt zur Phosphorylierung des NF- κ B Inhibitors I κ B, der dann ubiquitinyliert und schließlich degradiert wird. NF- κ B kann somit in den Zellkern translozieren und dort die Expression von inflammatorischen Zytokinen induzieren (AKIRA, TAKEDA, 2004).

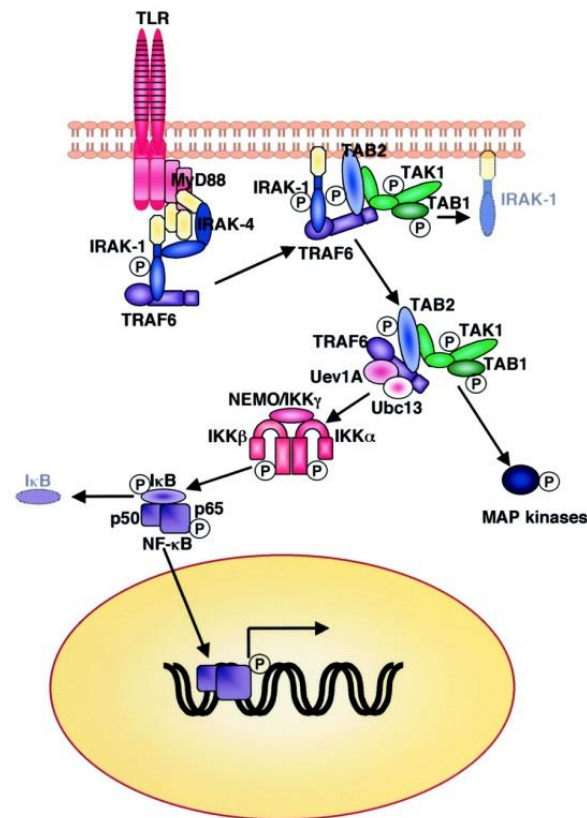


Abbildung 8: Der MyD88-abhängige Signalweg

führt über Aktivierung von NF- κ B zur Induktion der Genexpression inflammatorischer Zytokine (AKIRA, 2003), *mit Erlaubnis*

2.4.6. MyD88-unabhängige Signalkaskade: TRIF

Das Adaptormolekül TRIF wurde in vielen Geweben unter auch im Herzen nachgewiesen. Seine höchste Expression scheint im Skelettmuskel zu sein (NISHIMURA, NAITO, 2005). Humanes TRIF ist ein großes Polypeptid aus 712 Aminosäuren und wurde als TLR3-asoziiertes Molekül durch zwei Hybrid-Screenings identifiziert (OSHIUMI et al., 2003; YAMAMOTO et al., 2002).

Kawai et al. zeigten, dass die Stimulation von TLR3 und 4 ohne die Aktivierung von MyD88 zur Induktion von Typ 1 Interferonen (IFN α/β) führt (KAWAI et al., 2001). Diese Immunantwort ist komplett MyD88-unabhängig aber gänzlich TRIF abhängig (YAMAMOTO et al., 2003). Die Expression von Interferon bzw. Interferon-assoziierten Genen benötigt neben NF- κ B den Transkriptionsfaktor IRF3 (Interferon-regulatory factor 3). Weil IRFs für die Induktion von Typ I IFN und IFN-abhängigen

Einleitung

Genen essentiell verantwortlich sind, erklärt dies die wichtige Rolle von TRIF für diesen Weg der Immunantwort (SATO et al., 2000; YONEYAMA et al., 1998).

Die TRIF-abhängige Aktivierung von IRF3 erfolgt über nicht kanonischen I κ B-Kinasen (IKKs) und IKK- ϵ (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon, inducible IKK, IKKi) und TBK1 (TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1). IRF3 wird phosphoryliert und transloziert schließlich nach Dimerisierung in den Zellkern. Daneben aktiviert TRIF über zwei unterschiedliche Signalwege den NF- κ B-Komplex. Durch aminoterminaler Anlagerung von TRAF6 (tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6) sowie durch carboxyterminale Anlagerung von RIP (Receptor-interactive protein 1) wird NF- κ B aktiviert.

Die Interaktion der beiden Toll-like Rezeptoren TLR3 und TLR4 mit TRIF als Adaptormolekül sind unterschiedlich. Während der TLR3-Rezeptor, der ausschließlich mit TRIF interagiert, direkt TRIF bindet, ist bei der TLR4 / TRIF-vermittelten Immunantwort das Adaptorprotein TRAM dazwischen geschaltet.

Die TLR-Signalwege sind heute immer noch nicht gänzlich beschrieben. So zeigten Akira et al., dass die Inhibition von TRIF auch Einfluss auf den TLR4 / MyD88-abhängigen Signalweg hat (AKIRA et al., 2003; HOEBE et al., 2003) und durch Hemmung von TRIF die Produktion inflammatorischer Zytokine erheblich herabgesetzt wird. Da der TLR4 medierte MyD88-Signalweg selbst nicht beeinträchtigt ist, müssen ein oder auch mehrere noch nicht definierte Moleküle neben oder vor NF- κ B für die Produktion inflammatorischer Zytokine verantwortlich sein.

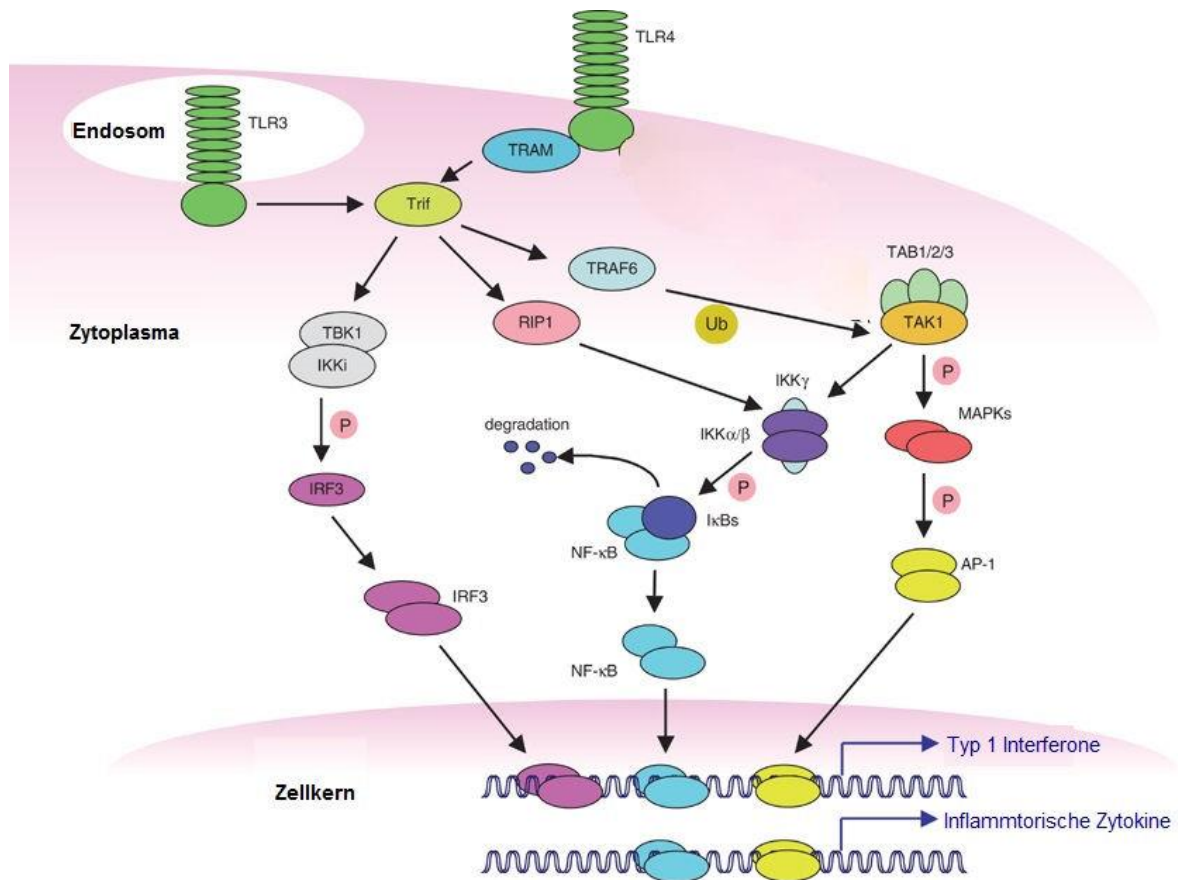


Abbildung 9: Der MyD88-unabhängige TRIF-Signalweg

Die Ligandeninteraktion von TLR3 (Ligand: ds-RNA) oder TLR4 (Ligand: LPS) aktiviert den TRIF-Signalweg, der über IRF3 bzw. NF-κB zur Induktion der Genexpression von Typ 1-Interferonen führt. Modifiziert nach (KAWAI, AKIRA, 2006)

2.4.7. Die Bedeutung der Inflammation bei maladaptiven kardialen Remodeling

Inflammatorische Signalwege sind involviert im maladaptiven kardialen Remodeling. Durch inflammatorische Einflüsse kommt es im betroffenen Gewebe zu einer veränderten Expression von Botenstoffen. Diese Botenstoffe wiederum initiieren pro- und anti-inflammatorische Vorgänge. Es wurde bereits gezeigt, dass Nachlastserhöhung zu kardialer Inflammation mit Makrophageninfiltration und perivaskulärer Fibrose führt. Daraus resultiert eine mit kardialer Hypertrophie einhergehende diastolische Dysfunktion (Nicoletti und Michel 1999; Kuwahara, Kai et al. 2003; Kuwahara, Kai et al. 2004). Die pathogene Bedeutung inflammatorischer Zytokine für das Remodeling ist durch verschiedene Mausmodelle belegt. So führte eine kontinuierliche systemische Gabe von TNF-alpha zu einer Verschlechterung der

LV-Pumpfunktion, einer Verkürzung der Myozyten und schließlich zu einer LV-Dilatation (BOZKURT et al., 1998). Im transgenen Mausmodell mit einer kardialen Überexpression von TNF-alpha entwickelten die Mäuse eine dilatierte Kardiomyopathie, bei der sich eine Hypertrophie, eine LV-Dilatation, interstitielle Fibrose, Apoptose der Myozyten und eine verringerte Auswurfraction zeigte (KUBOTA et al., 1997). Das Fehlen von TLR4 führte zu vermindert kardialer Hypertrophie und Inflammation (EHRENTAUT et al., 2015; EHRENTAUT et al., 2011; HA et al., 2005; KACZOROWSKI et al., 2009a; KACZOROWSKI et al., 2009b; KACZOROWSKI et al., 2009c). Singh et al. zeigten, dass die Aktivierung unterschiedlicher inflammatorischer Signalwege sich auch unterschiedlich auf das maladaptive Remodeling auswirkt. So war in MyD88 knock out Mäusen die Angiotensin II induzierte Hypertrophie sowie auch die Expression kardialer Gene eher erhöht, wohingegen in Mäusen mit nicht funktionellem TRIF die Hypertrophie sogar eher etwas gemildert und die Expression kardialer Gene erniedrigt war (SINGH et al., 2015).

2.5. Tiermodell der TRIF defizienten Maus

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden unter anderem am etablierten Tiermodell der TRIF defizienten Maus (C57BL/6J-Ticam1^{Lps2}/J, Jackson Laboratories) durchgeführt. Die Mauslinie wurde mittels ENU (Ethylnitrosoharnstoff)-Behandlung generiert. Dieses Mutagen bewirkte innerhalb des TRIF-Gens die Deletion eines einzelnen Guanins im Codon 708, was wiederum zu einer Frameshift-Mutation führte wobei die letzten 24 C-terminalen Aminosäuren durch 11 unzusammenhängende Aminosäuren ausgetauscht wurden.

Nachgewiesen wurde diese Mutation erstmals über die Fähigkeit der murinen Makrophagen auf eine LPS-Behandlung zu antworten. Diese Mäuse wurden über ihre Resistenz gegenüber den toxischen Effekten von LPS selektiert. TRIF-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage nach Infektion mit murinem Zytomegalievirus, Type I Interferon zu produzieren. Abgesehen von einer veränderten Immunantwort sind die C57BL/6J-Ticam1^{Lps2}/J - Mäuse phänotypisch unauffällig. Sie sind lebensfähig, fortpflanzungsfähig, normal groß und zeigen weder physische Abnormalitäten noch Verhaltensauffälligkeiten. (HOEBE et al., 2003).

2.6. Zielsetzung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen die Bedeutung des MyD88-unabhängigen TRIF Signalwegs im Rahmen einer kardialen Hypertrophie näher charakterisieren. An TRIF defizienten Mäusen soll unter Zuhilfenahme des etablierten Tiermodells der Nachlast-induzierten Hypertrophie (Transaortaler Konstriktion, TAC) der Einfluss des TLR-Adaptorproteins TRIF auf den kardialen Phänotyp und funktionelle Parameter beschrieben werden. *In vivo* und *In vitro* Analysen sollen die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen sowohl auf Protein- als auch auf molekularer Ebene beleuchten.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Allgemeine Laboreinrichtungen, verwendete Maschinen und Arbeitsgeräte entsprachen den in der Molekularbiologie üblichen Anforderungen und sind hier nicht gesondert aufgeführt bzw. im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode erwähnt. Die Materialien, welche für die Durchführung der Arbeit im Speziellen wesentlich waren, sind in folgender Tabelle aufgelistet oder im Zusammenhang mit der jeweiligen Methode erwähnt. Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen.

3.1.1. Kits

Tabelle 1: Kits

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
peqGOLD TriFast	Peqlab, Erlangen
KAPA SYBR FAST Universal	Peqlab, Erlangen
Absolutely RNA Microprep Kit	Stratagene, La Jolla, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies/Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies/Applied Biosystems, Darmstadt
miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden
miScript SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuickZyme™ Soluble COLLAGEN Assay	QuickZyme Biosciences, Leiden, NL
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
peqGold RNA Pure Peqlab	Biotechnologie GmbH, Erlangen
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden

3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Acrylamid/Bisacrylamid	Bio-Rad, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS	Serva, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Citraconsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eosin	Merck, Darmstadt
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HEPES	Serva, Heidelberg
Igepal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS	Roth, Karlsruhe
Sirius Red	Polyscience Inc., Cham, CH
St. Thomas Hospital-Lösung	Dr. Franz Köhler Chem., Bensheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRITC-konjugiertes Streptavidin	Dianova, Hamburg
Vectashield MountingMedium f. Fluorescence	Linaris, Dossenheim

Material und Methoden

3.1.3. Puffer und Lösungen

Citraconsäure-Anhydrid-

Puffer (pH 7,4)

0,05% Citraconsäure Anhydrid (v/v)

1 l H₂O_{dest}

Blocking-Puffer

5% Magermilchpulver (w/v) in PBS-Tween-Puffer

Eosin gelblich:

0,2% Eosin (w/v)

100 ml H₂O_{dest}

0,02% Eisessig (v/v)

Hämatoxylin nach Ehrlich

5% Hämatoxylin (w/v)

100 ml 96 % Isopropanol

100 ml H₂O_{dest}

100 ml reinstes Glycerin

7,5% Kalium-Aluminium-Sulfat (w/v)

100 ml 96 % Isopropanol

2,5% Eisessig (v/v)

Die Lösung muss nachfolgend lichtgeschützt gelagert werden und 2-4 Wochen bei Raumtemperatur reifen.

HCl-Alkohol

70% Isopropanol (v/v)

0,1% konzentrierte HCl (v/v)

Material und Methoden

Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) 118,5 mM NaCl
25 mM NaHCO₃
4,7 mM KCl
1,2 mM MgSO₄
2,5 mM CaCl₂
0,5 mM EDTA
11,1 mM Glucose
Begasung mit Carbogen (95% O₂/ 5% CO₂)

Lysepuffer für Proteine 100 mM Tris (pH 6,8)
4% SDS (v/v)
20% Glycerol (v/v)
0,1 mM PMSF
2 µM Leupeptin
1% Aprotinin (v/v)

Milz-EDTA-Puffer 100 ml 10xPBS
10 ml FKS
40 ml 0,5M EDTA
Ad 1000 ml H₂O_{dest}
Steril filtrieren

PBS-Puffer (10x) 1,4 M NaCl
27 Mm KCl
100 mM Na₂HPO₄
18 mM KH₂PO₄ (pH 7,4)

Material und Methoden

PBS-T-Puffer

1x PBS-Puffer
1% Tween20 (v/v)

Protein-Ladepuffer (5x)

0,25 M Tris/HCL (pH 6,8)
10% SDS (v/v)
50% Glycerol (v/v)
0,05% Bromphenolblau (w/v)
0,5 M DTT

Puffer zur Isolation von neonatalen Kardiomyozyten

ADS-Puffer

116 mM NaCl
20 mM HEPES
0,8 mM Na₂HPO₄
5,6 mM Glucose
5,4 mM KCl
0,8 mM MgSO₄ (x7H₂O)

Nach dem Lösen der Substanzen in H₂O_{dest} wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,35 eingestellt, die Lösung steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Enzym-Mix

90 ml ADS-Puffer
48 mg Pankreatin
40 mg Kollagenase Typ II

Nach dem Lösen der Enzyme im ADS-Puffer wurde die Lösung filtriert und auf Eis gehalten.

SDS-Elektrophoresepuffer

25 mM Tris/HCl
0,1% SDS (w/v)
200 mM Glycin (pH 8,2-8,4)

Material und Methoden

Sirius Red-Lösung 0,1%

0,1% Sirius Red-Lösung (v/v)

500 ml 1,2 % Pikrinsäure (pH 2,0)

Die angesetzte Lösung musste nachfolgend 1 Woche bei Raumtemperatur reifen.

SSC-Puffer (20x)

3 M NaCl (pH 7,2)

0,3 M Na-Citrat

1 l H₂O_{dest}

SSC-Tween-Puffer (4x)

4x SSC-Puffer

0,1% Tween20 (v/v)

Western Transfer-Puffer

25 mM Tris/HCl (pH 8,3)

192 mM Glycin

20% Methanol (v/v)

3.1.4. Real time Primer

3.1.4.1. Primer zur semi-quantitativen Bestimmung von mRNA

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Tabelle 3: Murine Primer

Target	Forward Primer	Reverse Primer
18s	TCA ACA CGG GAA ACC TCA C	ACC AGA CAA ATC GCT CCA C
ANP	CCT AAG CCC TTG TGG TGT	CAG AGT GGG AGA GGC AAG AC
BNP	GAC CAA GGC CTC ACA AAA GA	AGA CCC AGG CAG AGT CAG AA
CCL2 (MCP1)	TGC CCT AAG GTC TTC AGC AC	AAA ATG GAT CCA CAC CTT GC
CCL5 (RANTES)	GAC ACC ACA CCC TGC TGC T	TAC TCC TTG ATG TGG GCA CG
CCL11 (Eotaxin)	ACC GAG TGG TTA GCT ACC AGT TG	TGG TGA TGA AGA TGA CCC CTG
CX3CL1 (Fraktalkin)	TTA CGG CTA AGC CTC AGA GCA	CTC GGC CAA ACG GTG GT
CXCL9 (MIG)	AAT GCA CGA TGC TCC TGC A	AGG TCT TTG AGG GAT TTG TAG TGG
CXCL10 (IP10)	CCC ACG TGT TGA GAT CAT TG	CAC TGG GTA AAG GGG AGT GA
CXCL11 (I-TAC)	AAG TCA CGT GCA CAC TCC AC	CGT GTG CCT CGT GAT ATT TG
CXCL12 (SDF-1)	AAA CCA GTC AGC CTG AGC TAC C	GGC TCT GGC GAT GTG GC
IFN β	CGA CAA AGC ACT AGC ATT CG	TGA ATG GCA AAG GCA GTG TA
IL4	GCA ACG AAG AAC ACC ACA GA	ATC GAA AAG CCC GAA AGA GT
IL6	TCC TAC CCC AAT TTC CAA TG	ACC ACA GTG AGG AAT GTC CA
IL10	GCT CTT ACT GAC TGG CAT GAF	CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG
IRF3	ACG TGT CAA CCT GGA AGA GG	GGC ACC CAG ATG TAC GAA GT
Kollagen 1 α	TGA CTG GAA GAG CGG AGA GT	GTT CGG GCT GAT GTA CCA GT
TGF-beta	GAC TTT TCC GCT GCT ACT GC	AAT AGG GGC GTC TGA GGA
TNF-alpha	GAT TAT GGC TCA GGG TCC AA	CTC CCT TTG CAG AAC TCA GG
TRIF	TTG GGA CAC GAT CTA CGA CA	AGG AGC ACA GGA GAA AGC AG

3.1.4.2 Primer zur semi-quantitativen Bestimmung von microRNA

Tabelle 4: Murine Primer, TaqMan® MicroRNA Assay, Life Technologies/ Applied Biosystems, Darmstadt

miRBase ID	Mature miRNA-Sequenz
RNU6B	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT
mmu-miR-29b-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
mmu-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU

3.1.5 Western Blot: Antikörper

Tabelle 5: Western Blot. Primärantikörper. Zu detektierende Proteine, deren Molekulargewicht (kDa), verwendete Antikörper und deren Verdünnung

Protein	Antikörper	Verdünnung
AKT (60 kDa)	Polyklonaler anti-Akt IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt aM)	1:500
BAX (23 kDa)	Monoklonaler anti-BAX IgG, Maus (Santa Cruz, Heidelberg)	1:500
BCL (26 kDa)	Polyklonaler anti-BCL-2 IgG, Kaninchen (Santa Cruz, Heidelberg)	1:500
GAPDH (37 kDa)	Monoklonaler anti-GAPDH IgG, Maus (Santa Cruz, Heidelberg)	1:10.000
IRF3 (45-55 kDa)	Monoklonaler anti-IRF3 IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt aM)	1:1.000
mRNA Polymerase2 (220 kDa)	Monoklonaler anti-RN-Polymerase II IgG, Maus (Millipore, Schwalbach)	1:4.000
p16 (16 kDa)	Monoklonaler anti-p16 IgG, Maus (Santa Cruz, Heidelberg)	1:500
p53 (53 kDa)	Monoklonaler anti-p53 IgG, Maus (Santa Cruz, Heidelberg)	1:500
pAKT (60 kDa)	Polyklonaler anti-pAkt (S473) IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt aM)	1:500
pSmad3 (52 kDa)	Monoklonaler anti-pSmad3 (S423/425) IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt aM)	1:1.000
Smad2/3 (60/52 kDa)	Polyklonaler anti-Smad2/3 IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt aM)	1:1.000
Smad4 (70 kDa)	Monoklonaler anti-Smad4 IgG, Kaninchen (Cell signaling, Frankfurt aM)	1:1.000
TGF-beta (60 kDa)	Monoklonaler anti-TGF-beta1 IgG, Maus (Sigma, Taufkirchen)	1:250

Tabelle 6: Western Blot. Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper zur Immundetektion. Spezies, verwendete Antikörper und deren Verdünnung

Spezies	Antikörper	Verdünnung
Kaninchen	Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	1:4.000
Ziege	Peroxidase-gekoppelter anti-Ziege-Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	1:8.000
Maus	Peroxidase-gekoppelter anti-Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	1:5.000

3.1.6 Immunhistochemie: Antikörper

Tabelle 7: Immunhistochemie. Primärantikörper. Antigen, verwendete Antikörper und deren Verdünnung

Antigen	Antikörper	Verdünnung
CD3	Polyklonaler anti-CD3 IgG, Kaninchen (abcam, Cambridge, UK)	1:30
F4/80	Monoklonaler anti-F4/80 IgG, Ratte (abcam, Cambridge, UK)	1:30
α -sarkomerisches Aktin	Monoklonaler anti- α -sarkomerisches Aktin IgG, Maus, (Dianova, Hamburg)	1:30

Tabelle 8: Immunhistochemie. Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper. Spezies, verwendete Antikörper und deren Verdünnung

Spezies	Antikörper	Verdünnung
Maus	FITC-konjugierter anti-Maus IgM (Dianova, Hamburg)	1:50
Ziege	TRITC-konjugierter anti-Ziege IgG (Dianova, Hamburg)	1:30

Tabelle 9: Immunhistochemie. Biotin-gekoppelte Sekundärantikörper. Spezies, verwendete Antikörper und deren Verdünnung

Spezies	Antikörper	Verdünnung
Ratte	Biotin-konjugierter anti-Ratte IgG (Dianova, Hamburg)	1:30
Kaninchen	Biotin-konjugierter anti-Kaninchen IgG (Dianova, Hamburg)	1:30

3.1.7 Zellkultur

3.1.7.1 Zelllinien

THP1; ATCC, Manassas, USA: Immortalisierte humane monozytäre Zelllinie.
Nährmedium: RPMI 1640 (+ L-Glutamin) zuzüglich 10% Fötales Kälberserum (v/v).

Human Aortic Endothelial Cells (HAoEC); Promocell, Heidelberg
Nährmedium: Endothelial Cell Growth medium MV2, Promocell, Heidelberg
Zum Splitten der Zellen wurde aufgrund der geringen Serumkonzentration ein spezifischer DetachKit (HEPES BSS, Trypsin/EDTA und Trypsin-Neutralisierungs-Lösung), Promocell, Heidelberg, verwendet.

3.1.7.2 Primärkulturen

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten

Nährmedium: F-10 (Ham + Glutamin) zuzüglich 10% Pferde Serum (v/v) und 5% Fötales Kälberserum (v/v).

Neonatale Ratten-Fibroblasten

Nährmedium: DMEM zuzüglich 5% Fötales Kälberserum (v/v).

Um bakterielle Kontaminationen der Kulturen zu vermeiden, wurde den Medien 1% Streptomycin/Penicillin (v/v) zugegeben.

Bei der Herstellung der Hungermedien wurde jeweils der Serumanteil weggelassen.
Die Medien, Seren und Penicilline sowie Trypsin/EDTA wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Invitrogen (Basel, CH) bezogen.

3.1.7.3 SiRNAs zur Transfektion von Zellen

Tabelle 10: Flexi Tube siRNA, Qiagen, Hilden

siRNA	Gene	Spezies
HS_TICAM 1	TICAM 1	Mensch
Rn_TICAM 1	TICAM 1	Ratte
AllStars hs Cell Death Control siRNA	covered	Mensch
AllStars Mm/Rn Cell Death Control siRNA	covered	Maus, Ratte
AllStars Negative Control siRNA	Keine Homologie	Mensch, Maus, Ratte

3.1.8 Computersoftware

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die Programme MS Word Office 2010, MS Power Point 2010, GraphPad Prism 6.0, Labworks 3.0 und NIS 3.2 (Nikon) verwendet.

3.1.9 Statistik

Die experimentellen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM, „Standard error of the mean“) dargestellt. Zur statistischen Auswertung der durchgeführten Experimente wurden One-Way-Anova Analysen mit post Bonferroni-Tests zum Vergleich mehrerer Behandlungsgruppen bzw. ungepaarte T-Tests zum statistischen Vergleich zweier Gruppen verwendet. Die p-Werte sind 2-seitig mit $p < 0,05$; $p < 0,001$.

3.2 Methoden

Alle bei den einzelnen Methoden benötigten selbst angesetzten Puffer und Lösungen sind unter 1.1.3 Puffer und Lösungen zu finden.

3.2.1 Mauslinie und Tierhaltung

Im Versuch wurden C57BL/6J-Ticam1^{Lps2}/J Mäuse (Jackson Laboratories) verwendet (HOEBE et al., 2003). Die Zuchtpaare wurden über die Firma Charles River GmbH, Sulzfeld bezogen und die Zucht fand vor Ort statt. Als Kontrolle dienten C57BL/6J-Mäuse, die alters- und geschlechts-abgeglichen über Charles River GmbH Deutschland bezogen wurden. Alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehmigung gemäß §8 Tierschutzgesetz, Versuch-Nr. 01/2011). Die Tiere waren im Tierstall des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums Homburg/Saar untergebracht und wurden von den dort beschäftigten Tierpflegern versorgt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen, d.h. 3-10 Tieren gleichgeschlechtliche Tiere wurden in normierten Makrolonkäfigen bei einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus sowie bei 20°C Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Standardisiertes Alleinfuttermittel und Wasser wurden den Tieren ad libitum zur Verfügung gestellt und deren Aufnahme regelmäßig kontrolliert.

3.2.1.1 Tiermodell zur Induktion einer pathologischen Hypertrophie in Folge einer Erhöhung der Nachlast durch Aortenligatur (Transaortaler Konstriktion, TAC)

3.2.1.1.1 Narkoseeinleitung und OP-Vorbereitung der Versuchstiere

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte mit einer 2:1 Mischung aus Ketavet® (100 mg/kg Ketaminhydrochlorid, Pfizer, Karlsruhe) zur Sedation und Analgesie und Rompun® (10mg/kg Xylazinhydrochlorid, Bayer Healthcare, Berlin) zur Muskelrelaxation, die in einer 1:10 Verdünnung mit 0,9% NaCl 0,3ml pro 20g Körpergewicht intraperitoneal appliziert wurde. Die gewählte Dosis und Zusammensetzung führte in der Regel nach 15 Minuten für die Dauer von circa 50

Minuten zu einer tiefen Narkose des Tieres. Das prophylaktische Auftragen von Augensalbe (Bepanthen®, Roche, Mannheim) verhinderte während des Eingriffes das Austrocknen der Augen. Nachfolgend wurde das OP-Feld links des Sternums durch Rasur vorbereitet. Zur Konstanthaltung der Körpertemperatur während des Eingriffs und um eine Hypothermie der Tiere zu vermeiden, wurde auf einer durch ein darunter liegendes Heizkissen erwärmten Glasplatte, operiert. Die OP selbst erfolgte unter einem OP-Mikroskops (Nikon SMZ645, Nikon, Düsseldorf).

Die narkotisierte Maus wurde danach für die Durchführung der Intubation in Schnüffelposition mittels Fadenschlinge um die Schneidezähne fixiert. Die Intubation erfolgte bei geöffneter Stimmritze nach seitlicher Positionierung der Zunge mithilfe einer gebogenen Pinzette und unter direkter Beleuchtung des Larynx durch die Lichtquelle des OP-Mikroskops. Im Anschluss wurde der selbst hergestellte Tubus (22-gauge Venenverweilkanüle, Venflon™Pro Safety, BectonDickinson, Heidelberg und 18-gauge Kanüle, 100 Sterican®, Braun, Berlin) vorsichtig in die geöffnete Trachea geschoben. Die intubierte Maus wurde in Rechtsseitenlage mittels Fixierung der 4 Füße mit Leukoplaststreifen (Beiersdorf AG, Hamburg) auf der Glasplatte flach positioniert und der Tubus mit dem Y-Stück des tottraumoptimierten Beatmungsgeräts (Mouse Ventilator miniVent Typ 845, Hugo Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) verbunden und ebenfalls fixiert. Die Beatmung erfolgte mit Raumluft mit einem Tidalvolumen von 200µl und einer Atemfrequenz von 120/min.

3.2.1.1.2 Transaortaler Konstriktion

Nach Linksthorakaler Eröffnung unter minimal traumatischen Bedingungen unter Zuhilfenahme eines Kinder-Augenlidspreizers zur Freihaltung des OP-Feldes, wurde einer Fadenschlinge (Perma-Hand Seide, 6-0, 3/8 c, Ethicon, Norderstedt) unter der Aorta im Bereich des Aortenbogens durchgezogen. Durch das vorübergehende Einbinden einer 26- bzw. 25-gauge Kanüle wurde ein definierter Durchmesser (Mausgewicht <25 g: 400µm; >25g: 450µm) der Fadenschlinge erzielt. Die Ligatur erzeugt einen Druckgradienten über der Aorta ascendens und führt durch eine Druckerhöhung im linken Ventrikel, welche um den Betrag des Druckgradienten zunimmt, zu einer Hypertrophie und Dilatation. Nach der Ligatur wurde der Thorax durch vernähen in verschiedenen Lagen verschlossen. Sobald die Maus spontan zu atmen begann und aus der Narkose erwachte, wurde das Tier extubiert. Um einen

Schmerzmittelspiegel vor dem Ausschleichen der Narkose aufzubauen wurden direkt 5mg pro kg des Analgetikums Rimadyl® (15fach verdünnt mit 0,9% NaCl, Carprofen, Pfizer, Karlsruhe) intraperitoneal appliziert. In der Regel setzten 10 min nach Extubation die Zwischenzehenreflexe und die Schnurrhaarbewegungen ein und 30-40 min nach Eingriff waren die operierten Tiere bewegungsfähig.

3.2.1.1.3 Sham-Operation

Die sogenannte Sham-Operation verlief bis auf das Ausbleiben der Ligatur wie oben beschrieben, d.h. nach Durchzug des Fadens unter der Aorta wurde der Faden wieder entfernt und der Thorax ohne weitere Manipulation verschlossen.

3.2.1.2 Tötung der Versuchstiere und Organentnahme

Die Versuchstiere erhielten zur Euthanasie pro 20g Körpergewicht eine intraperitoneale Injektion von 0,3 ml eines unverdünnten Ketavet®-Rompun®-Narkosegemischs (100mg/kg Ketaminhydrochlorid, Pfizer, Karlsruhe; 10mg/kg Xylazinhydrochlorid, Bayer Healthcare, Berlin) im Verhältnis 2:1 Unmittelbar nach Eintritt des Todes wurde der Thorax durch einen parasternalen Schnitt eröffnet. Nach Eröffnung des Abdomens per Laparotomie erfolgte die Entnahme der Milz, die bis zur anschließenden Weiterverarbeitung in 2ml steriler isotonischer Kochsalzlösung in einem 15ml Reaktionsgefäß auf Eis gelagert wurde. Nachfolgend wurde das Herz entnommen und gewogen. Aus dem Myokard wurde mittventrikulär eine Gewebescheibe der Dicke 2mm herausgeschnitten und diese zum Zwecke späterer histologischer Analysen in 4% Paraformaldehyd gelagert. Der übrige Teil des Myokards wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufbereitung für molekularbiologische bzw. für Protein-Analysen bei -80°C weggefroren. Des Weiteren wurde die Lunge explantiert, im Feuchtzustand gewogen und über Nacht bei 37°C inkubiert, um am Folgetag die Trockengewicht des Organs zu bestimmen. Das Abwiegen der Organe im Feucht- und Trockenzustand diente dazu, eventuell im Behandlungsverlauf entstandene Ödeme zu identifizieren und gegebenenfalls Gewichtszunahmen der Organe als Resultat dieser Flüssigkeitseinlagerungen und nicht als Folge der jeweiligen Behandlung zu verifizieren. Die Tibialänge wurde nach Amputation des linken Hinterbeins mit einem

Lineal ausgemessen. Anschließend wurde das Herzgewicht in Relation zum Körpergewicht und zur Tibiallänge ermittelt.

3.2.2 Echokardiographie

Die echokardiographische Analyse diente der zweidimensionalen Determination morphologischer Aspekte und der Ermittlung funktioneller Parameter.

3.2.2.1 Narkoseeinleitung und Versuchsvorbereitung

Die Narkose wurde in einer Induktionskammer mit 3% Isofluran, gemischt mit 100% O₂ bei einer Durchflussrate von 1,0l/min eingeleitet. Nach Positionierung der Maus in Rückenlage auf einer Plattform mit eingebetteten EKG-Elektroden wurde die Anästhesie via Inhalation von 1,0 - 1,5% Isofluran gemischt mit 100% O₂ (1,0 l/min) über eine mit dem Anästhesie-System verbundene Nasenmaske aufrechterhalten. Nach Enthaarung im Brustbereich (Nair®, Church und Dwight, Mississauga, CAN). Erfolgte die Fixierung der Maus mit allen vier Füßen auf den mit Elektrodengel (SignaCreme, Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA) versehenen EKG-Elektroden, Die Herzfrequenz konnte in der Regel kontrolliert auf etwa 400 Schläge/min gehalten werden. Während der gesamten Prozedur überwachte eine rektale Temperatursonde die Körpertemperatur, die mithilfe der Heizfunktion der Plattform und einer Wärmelampe im Bereich von 37,0°C±1,5°C konstant gehalten wurde.

3.2.2.2 Bildgebung, Messung und Kalkulation morphologischer und funktioneller Parameter

Mit dem Visualsonics Vevo®770high-Resolution in vivo Micro-Imaging System (Visualsonics Inc., Toronto, CAN) unter Verwendung des Schallkopfs RMV707B (Real-Time Micro Visualization mouse cardiac, 15-45 MHz) erfolgte die Bildgebung. In parasternaler Längsachsenprojektion nach Erfassen des Apex und der Aortenwurzel in einer Linie wurden zuerst zweidimensionale (B-Mode) Bilder aufgenommen. In Enddiastole und Endsystole erfolgten in gleicher Einstellung eindimensionale M-Mode Messungen (siehe Abbildung 10) apikal des Papillarmuskels. Damit wurde das interventrikulären Septums (IVSd/s [mm],

Material und Methoden

diastolisch/systolisch), der linksventrikulären internen Durchmesser in Enddiastole (LVIDd/LVEDD [mm]) bzw. Endsystole (LVIDs/LVESD [mm]) und der linksventrikulären posterioren Wand (LVPWd/s [mm]; diastolisch/systolisch) gemessen. Ebenfalls in dieser Projektion wurden bei drei Herzzyklen die linksventrikuläre Kavitätsgrößen und Wanddicken gemessen und gemittelt. Um annähernd mittventrikuläre M-Mode Aufzeichnungen zu erfassen, wurde der Schallkopfs um 90° gedreht. In dieser Kurzachsenprojektion erfolgte die Standardmessung der linksventrikulären anterioren Wand (LVAWd/s [mm]; diastolisch/systolisch) bei drei Herzzyklen. Um Bildartefakte aufgrund der Atembewegung zu minimieren wurden alle Messungen in der Expirationsphase aufgezeichnet. Unter Verwendung der Visualsonics Vevo®770 Software wurden ausgehend von den M-Mode Messungen unter Verwendung unten aufgeführter Gleichungen folgende funktionellen Parameter kalkuliert: Die linksventrikuläre Masse (LV Masse [g]) und das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVED vol [μl]), sowie die linksventrikuläre Verkürzungsfraction („Fractional shortening“, FS [%]).

$$\text{LV Masse [g]} = [1,05\text{mg/ml} \cdot ((\text{IVSd} + \text{LVIDd} + \text{LVPWd})^3 - \text{LVIDd}^3)]$$

$$\text{FS [\%]} = ((\text{LVED vol} - \text{LVES vol}) / \text{LVED vol}) \cdot 100$$

$$\text{LVED vol [\mu l]} = ((7,0/2,4 + \text{LVIDd}) \cdot \text{LVIDd}^3)$$



Abbildung 10: M-Mode Aufzeichnung

3.2.3 Working Heart

3.2.3.1 Prinzip

Im Working Heart Perfusions-Modell wird durch eine Perfusion mit Puffer der Fluss des Blutes im Herzen nachgestellt. Die Working Heart Methode erlaubt dem Herzen seine physiologische Pumpfunktion aufrecht zu erhalten, das heißt, seine Druck/Volumen-Arbeit zu verrichten. In der Working Heart Apparatur (IH-SR Perfusions-Apparat 844/1, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) (Abbildung 11) kann eine komplette Analyse der hämodynamische Parameter durchgeführt werden. Der Aufbau der Apparatur erlaubt es sowohl Herzfrequenz als auch Vorlast und Nachlast separat und systematisch zu variieren und somit die Herzfunktion mit unterschiedlichsten Fragestellungen zu untersuchen.

Durch die Variation der Höhe der Flüssigkeitssäule kann die Vorlast auf pathologische Werte bis zu 30mmHG und angehoben werden. In der Nachlastsäule kann mittels einer Gummimembran die Nachlast auf 0 bis 300mmHg eingestellt werden. Über einen externen Schrittmacher wird der rechte Vorhof stimuliert und somit eine beliebige Herzfrequenz erzeugt. Im „Working Heart-Modus“ werden der Aortenfluß über einen Flußmesser und der Koronarfluß über die Pulmonalkanüle bestimmt. Durch Addition von Aortenfluß und Koronarfluß kann dann das Herz-Zeitvolumen ermittelt werden. Ein im linken Ventrikel platzierter Druckvolumenkatheter erlaubt die Messung der Druckveränderungen während des Herzzyklus (LVESP, LVEDP, dp/dt_{min} , dp/dt_{max} , Relaxionskonstante τ).

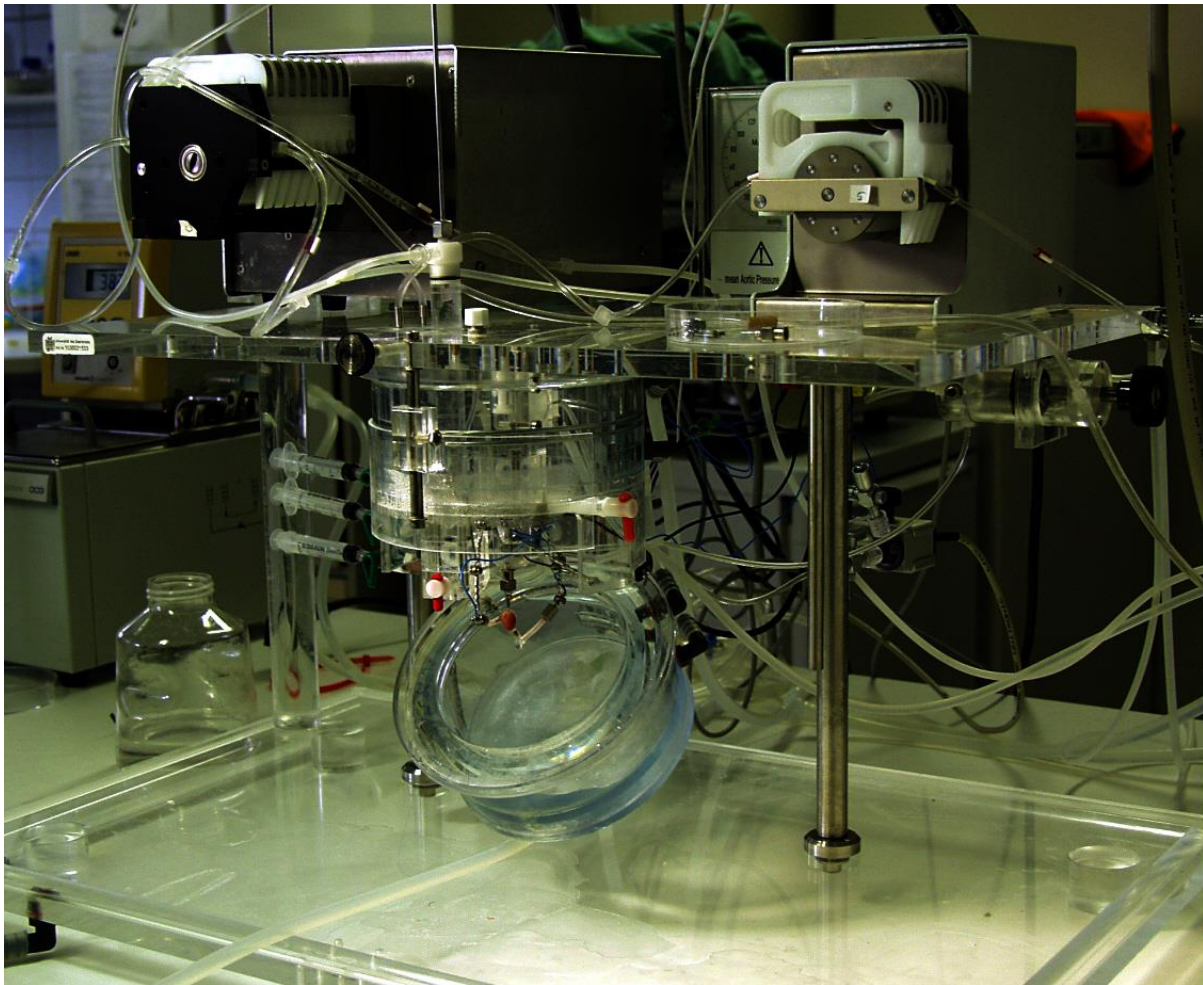


Abbildung 11: Aufbau der Working Heart Apparatur

3.2.3.2 Versuchsdurchführung

Den Mäusen wurde ca. 15 min vor Euthanasie intraperitoneal 100IU Heparin injiziert. Die Euthanasie erfolgte dann durch intraperitonealer Verabreichung eines unverdünnten Ketavet®-Rompun®-Narkosegemischs (100 mg/kg Ketaminhydrochlorid, Pfizer, Karlsruhe; 10mg/kg Xylazinhydrochlorid, Bayer Healthcare, Berlin) im Verhältnis 2:1 und 0,3 ml pro 20 g Körpergewicht. Unmittelbar nach Eintritt des Todes wurde der Thorax durch einen parasternalen Schnitt eröffnet, das Herz entnommen und in eiskalte kardioplege Lösung (St. Thomas-Hospital-Lösung, Dr. Franz Köhler Chemie, Bensheim) überführt. Nach Entfernung von Perikard, Lungenresten und Trachea wurde die Aorta mit einer 18-G Metallkanüle kanüliert und in der Working Heart Apparatur mit Krebs-Henseleit-Puffer und einem Perfusionsdruck von 60mmHG perfundiert (TIJSEN et al., 2014). Nach ausreichender Perfundierung des Herzens im Langendorf-Mode erfolgte im Rahmen der Working

Material und Methoden

Heart-Präparation (Abbildung 11) die Positionierung einer über die pulmonale Vene eingeführten 16-G Stahlkanüle im linken Atrium. Anschließend wurde die Kanüle an eine mit Krebs-Henseleit-Puffer befüllten und auf 38°C erwärmten Säule (Wasserummantelung) angeschlossen, sodass im Herzen während des Arbeits-Modes (Vorlast: 10mmHg, Nachlast: 60mmHg) eine konstante Temperatur von 37°C vorlag. Zwei in Polyesterharz eingebettete Platin-Elektroden wurden am rechten Atrium angebracht und damit die Herzfrequenz auf ca. 400 Schläge pro Minute (bpm) angeregt.

Die links-ventrikuläre systolische und diastolische Funktion wurden mittels eines Druck-Volumen-Katheters (Millar 1.4 F SPR-835, Millar, Houston, Texas) gemessen. Dazu wurde der Katheter nach Punktation der Herzspitze mit einer 22 ¼ -G Nadel in die Kavität des linken Ventrikels eingeführt. Das enddiastolische Druck-Volumen-Verhältnis (ESPVR) und die dazugehörige Steigung der EES (end-systolische ventrikuläre Elastizität) wurden durch eine Erhöhung des Nachlast von 60mmHG auf 100mmHG beurteilt. Dabei wurden sowohl die Vorlast bei 10mmHG als auch die Herzfrequenz bei 400bpm konstant belassen. Zum Schluss wurde durch die Zugabe von 5µl hypertoner Salzlösung (5%) über die Kanüle im linken Atrium die Wanddicke bestimmt (Transientenveränderung in der Leitfähigkeit des Krebs-Henseleit-Puffers in der linksventrikulären Kavität).

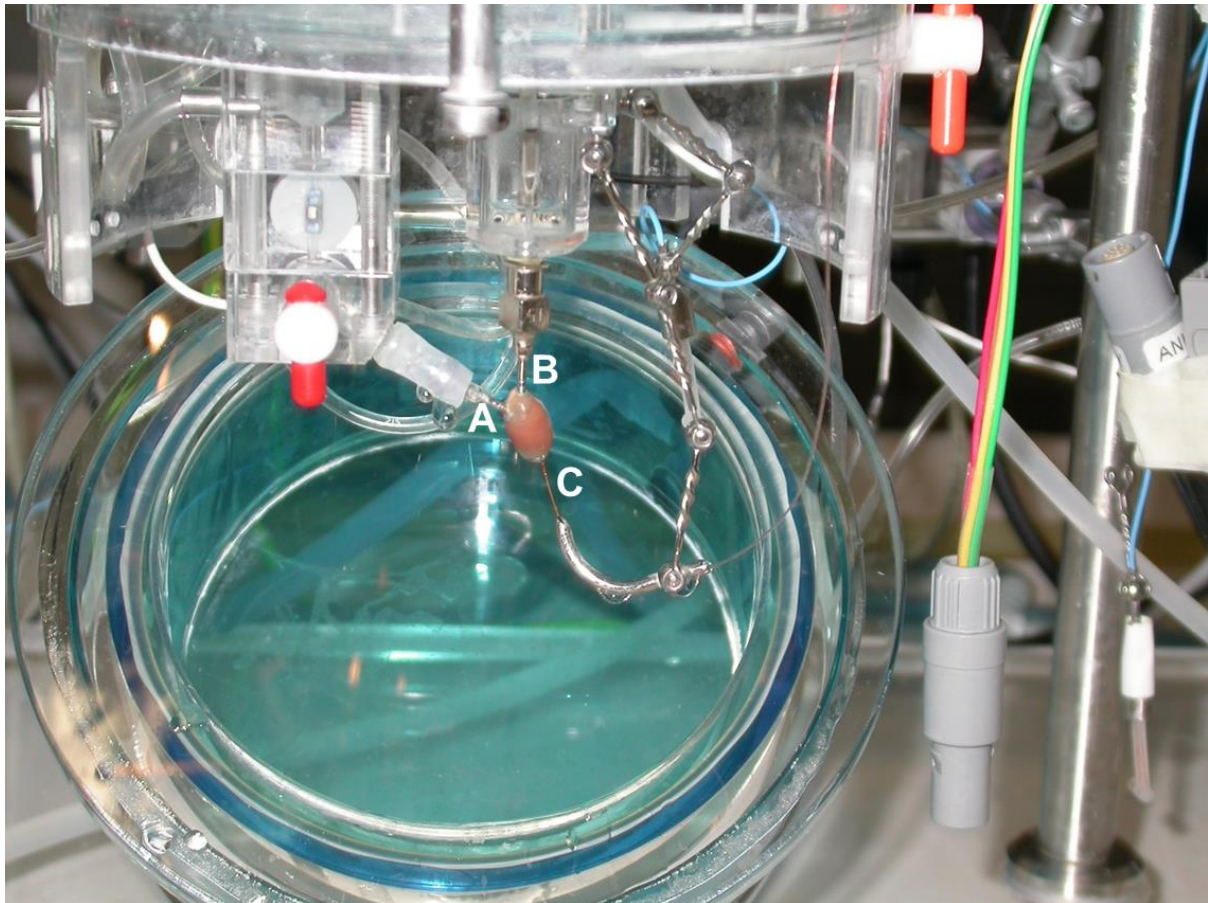


Abbildung 12: Ein in die Working Heart Anlage eingespanntes Herz

Über die im linken Vorhof positionierte Kanüle (A) wird das Herz mit Perfusionslösung befüllt, welche über die Aortenkanüle (B) in die Nachlastsäule abfließt. Die Messung der Druckveränderung erfolgt über im linken Ventrikel befindlichen Druckvolumenkatheter (C).

3.2.4 Zellkulturtechniken/ In vitro-Analysen

Alle Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Zellkulturplatten und sterilen Verbrauchsmaterialien wurden von Greiner-bio.one, Frickenhausen, TPP, Trasadingen, Schweiz oder BD-Falcon, Heidelberg bezogen.

3.2.4.1 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen sollte möglichst rasch erfolgen. Deshalb wurde zuerst das Cryoröhrchen mit der Zellsuspension (ca. 1ml) in einem 37°C warmen Wasserbad unter Schütteln erwärmt, bis ca. 50% aufgetaut waren. Anschließend wurde die

Zellsuspension in eine 100mm-Zelkulturschale mit 9ml Zellkulturmedium überführt und durch Schwenken gemischt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.4.2 Passagieren von adhärenenten Zellen

Nach dem Absaugen des Mediums, wurden die Zellen mit 5ml 1xPBS wachen und mit 1-2ml Trypsin/EDTA für 0,5 bis 2 min bei 37°C inkubiert. Dabei wurde das Ablösen der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Der Vorgang wurde dann durch Zugabe von 2ml Medium gestoppt und die abtrypsiniierten Zellen wurden anschließend durch 3 min Zentrifugation bei 1000rpm (200g) pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend angepasst an die Proliferationsrate der Zellen in einem entsprechenden Volumen Medium suspendiert und die Zellen wieder ausgesät. Anmerkung: Bei HAoEC-Zellen wurde zum Splitten ein spezifischer DetachKit benötigt.

3.2.4.3 Passagieren von Suspensionskulturen

Bei Suspensionszellen entfällt der Ablöseschritt. Die Zellsuspension kann direkt überführt und zentrifugiert (siehe 3.2.4.2) und anschließend verdünnt werden.

3.2.4.4 Einfrieren von Zellen

Nach Ablösen und Zentrifugation der Zellen (siehe 3.2.4.2) wurden die sedimentierten Zellen in 1 ml eiskaltem FCS + 10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sofort in ein eisgekühltes Cryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C zwischengelagert. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

3.2.4.5 Bestimmungen der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10µl einer Zellsuspension mit 10µl Trypanblau vermischt. Zellen, die keine intakte Membran mehr aufweisen, nehmen den Farbstoff Trypanblau auf. So lassen sich tote Zellen anhand ihrer Blaufärbung mikroskopisch erkennen. 10µl dieser Verdünnung wurden auf eine einer Neubauer-Zählkammer

pipettiert. Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurden jeweils die ungefärbten Zellen der vier Quadranten eines Kreuzes ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnung ergab sich aus nachfolgender Formel die Gesamtzellzahl der Suspension.

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert} \times 2 \times 10^4 \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

3.2.4.6 Kultivierung von THP1- Zellen

THP1-Zellen wachsen als Suspensionskultur und wurden in RPMI-Medium kultiviert (Siehe auch 3.2.4.3).

3.2.4.7 Kultivierung von HAoEC-Zellen

Die HAoEC-Zellen wurden entsprechend der allgemeinen Zellkulturtechniken (siehe auch 3.2.4.2) kultiviert. Für unsere Versuche wurden Zellen bis höchstens p6 (Passage 6) verwendet.

3.2.4.8 Isolation und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Aus dem explantierten Herzen von neonatalen Ratten wurde eine Kardiomyozyten-Primärkultur, d.h. eine nicht-immortalisierte Zelllinie, die nur eine begrenzte Zeit in Kultur gehalten werden kann, gewonnen.

Zur Isolation neonataler Kardiomyozyten wurden 3-5 Tage alte Sprague Dawley Ratten der Charles River GmbH, Sulzfeld verwendet. Um eine ausreichende Kardiomyozyten-Dichte zu erzielen, wurden mindestens 10 Herzen pro Isolation verwendet. Die Tötung der Ratten erfolgte durch Dekapitieren mittels einer großen Schere. Der Körper wurde unmittelbar nach der Dekapitation kurz in 70% Ethanol gespült. Zur Entnahme des Herzens wurde ein parasternaler Schnitt in Richtung Diaphragma angelegt und das Herz durch leichten Druck des Daumens auf den Thorax seitlich des Einschnitts herausgedrückt und mit einer kleinen Schere explantiert. Die Herzen wurden zunächst in einer 100mm-Zellkulturschale in eiskaltem ADS-Puffer gesammelt und nach Entfernung der Atrien und der großen Gefäße in eine weitere ADS-Puffer gefüllte Schale auf Eis überführt. Nachdem die

Material und Methoden

Herzen durch jeweils etwa 25 Schnitte mit einer Feinschere zerkleinert wurden, wurde der ADS-Puffer abgesaugt. Im Anschluss erfolgte ein Gewebeverdau um die Zellen aus dem Gewebeverbund zu lösen und zu vereinzeln. Dazu erfolgte die Zugabe von 10ml Enzym-Mix aus Pankreatin und Kollagenase zusammensetzt. Pankreatin enthält unter anderem aus Amylasen, Lipasen und verschiedenen Proteasen. Die Kollagenase ist eine Protease, die das Separieren der kardialen Zellen aus der extrazellulären Matrix bewirkt. Die Gewebestücke/Enzym-Mix-Suspension wurde in eine sterile Flasche überführt und 5 min im Schüttel-Wasserbad bei 90 U/min und 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen. Nach einer weiteren Zugabe von 10ml Enzym-Mix wurden die Gewebestücke für 20 min erneut unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Der Überstand wurde in ein steriles 50ml Reaktionsgefäß überführt und der durch die Enzyme katalysierte Verdau durch Zugabe von 2ml NCS (Neonatales Kälberserum) abgestoppt. Diese Zellsuspension wurde dann für 5 min bei 700rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch vorsichtiges Schütteln in weiteren 4ml NCS gelöst. Die Suspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Gewebeverdaus wurde mit folgenden Inkubationszeiten im Schüttel-Wasserbad fünf Mal wiederholt: 25 min, 25 min, 15 min, 10 min, 10 min. Nach dem letzten 10 minütigen Verdau wurden alle 6 Suspensionen in einem 50ml Reaktionsgefäß gesammelt und 5 min bei 700rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 4 ml Medium durch vorsichtiges Schütteln gelöst und anschließend filtriert. Der Filter (Falcon Cell Strainer, 70µm) wurde vor und nach der Filtration der Suspension mit jeweils 1 ml Nährmedium (siehe 3.1.7.2) gespült, sodass sich ein Endvolumen von 6ml ergab. Im Anschluss erfolgten die Aufreinigung und die Separation der Herzmuskelzellen von den ebenfalls in der Suspension enthaltenen Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Die Trennung erfolgte über die Adhäsionseigenschaften dieser Zelltypen, welche im Gegensatz zu Kardiomyozyten auf unbehandelten Plastikoberflächen innerhalb kurzer Zeit adhären. Je 3ml der Suspension wurden auf eine 6-cm²-Schale pipettiert und für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium mit den darin enthaltenen Kardiomyozyten in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt. Mehrmaliges Spülen der Platten mit je 2 ml frischem Medium diente der Aufnahme der größtmöglichen Kardiomyozyten-Anzahl in die Zellsuspension. Nach jedem Spülvorgang wurde der

Anteil nicht-adhärenter Zellen auf den beiden Platten mikroskopisch kontrolliert. Die adhärenen Zellen wurden wie unter 3.2.4.9 beschrieben zur Gewinnung der Fibroblasten weiter kultiviert. Anschließend erfolgte eine Zellzahlbestimmung (siehe 3.2.4.5). Die Zellsuspension wurde durch Zugabe von Nährmedium auf das gewünschte Volumen gebracht und je nach Verwendungszweck in entsprechende Kulturgefäße ausgesät. Das Aussäen in der optimalen Konzentration gewährleistete, dass die Zellen nach einer Adhärenzphase von 48h bei 37°C und 5% CO₂ eine Dichte von etwa 80% erreicht hatten. Waren ausreichende Adhärenz und Kontraktilität der Herzmuskelzellen durch mikroskopische Beurteilung gewährleistet, wurden die Zellen in den Versuch gebracht.

3.2.4.9 Isolation und Kultivierung neonataler kardialer Rattenfibroblasten

Die Fibroblasten wurden wie unter 3.2.4.8 beschrieben aus neonatalen Sprague Dawley Ratten gewonnen und durch Adhäsion von Kardiomyozyten getrennt. Die p0-Generation wurde in F10-Medium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach zwei Tagen waren die Zellen zu etwa 90% konfluent, so dass sie, je nach weiterem Verwendungszweck, auf mehrere 60mm Zellkulturschalen aufgesplittet wurden. Ab dieser Passage (p1) wurde zur Anregung des fibroblastenspezifischen Wachstums DMEM-Nährmedium verwendet. Sobald der Zellrasen eine Dichte von 90% erreicht hatte, wurde im Verhältnis 1:3 gesplittet. In der Regel wurden die Fibroblasten aus Passage 3 in den Versuch genommen. Dazu wurde die Zellsuspension auf die gewünschte Konzentration durch Zugabe von DMEM-Medium eingestellt und jeweils 3ml Medium mit 6×10^5 Zellen in pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät.

3.2.4.10 Isolation und Stimulation von mononukleären Zellen aus der Milz für Protein und RNA-Analysen

Zur Isolation von mononukleären Zellen (PBMNCs) wurde die frisch entnommene in PBS gelagerte Milz unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Dazu wurde die Milz in eine 100mm Zellkulturschale überführt, in der sich 15ml Milz-EDTA-Puffer befand. Mithilfe von zwei gebogenen Kanülen (24g) wurde die Milz ausgestrichen. Die so entstandene Zellsuspension wurde in eine 20ml- Spritze mit 18G – Kanüle mehrmals auf- und abgezogen. Danach wurde die Zellsuspension durch einen 70µm Zellfilter in ein 50ml Falcon überführt und mit sterilem PBS auf 35ml aufgefüllt. Anschließend wurden 15ml Ficoll (Ficoll-Paque Premium 1,084 ± 0,001g/ml, GE Healthcare) vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet und 20 min bei 1200g (2400rpm) ohne Bremse zentrifugiert. Der dadurch entstandene Zellring wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches 50ml Falcon überführt. Nach Auffüllen mit PBS auf 50ml wurde 15 min bei 1200g (2400rpm) und Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 5ml RPMI-Medium resuspendiert und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät. Zur Aktivieren der Makrophagen wurden die Zellen direkt mit 10ng/ml LPS für 3h stimuliert und dann für molekularbiologische Analysen geerntet (siehe 3.2.5).

3.2.4.11 Transfektion von Zellen

Zum knock down der TRIF-Expression in vitro wurden verschieden Zellarten mit spezie-spezifischer siRNA für TRIF und entsprechender Negativ- bzw. Positiv-Kontroll-siRNA (Qiagen, Hilden) (siehe 3.1.7.3, Tabelle 10) transfiziert. Das Einbringen der siRNA erfolgte mithilfe des HiPerFect-Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden).

3.2.4.12 Transfektion und Stimulation von THP1- Zellen

Für die Transfektion der THP1-Zellen wurden diese mit einer Konzentration von entweder 2×10^5 Zellen/Well in eine 24-Well-Plate oder 6×10^4 Zellen/Well in eine 96-Well-Plate ausgesät. Anschließend wurde durch Zugabe von 100ng/ml PMA und Inkubation über Nacht (37°C, 5%CO₂) eine Differenzierung zu Makrophagen induziert. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und pro Well

Material und Methoden

100µl bzw. 50µl frisches RPMI zu den nun adhärennten Zellen gegeben. Für die Transfektion mit HiPerFect Transfektionsreagenz und TRIF- bzw. Kontroll-siRNA wurde je siRNA folgender Ansatz hergestellt:

Tabelle 11: Transfektionsansatz für THP1-Zellen

	Pro 24 Well	Pro 96 Well
Zellzahl	2×10^5	6×10^4
Hungermedium	100µl	22,75µl
HiPerFect Transfektionsreagenz	9µl	2,25µl
siRNA (20µM)	1,5µl	0,5µl

Jeder Transfektionsansatz wurde für 5-10 min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert. Danach wurden 100µl bzw. 50µl der Lösung tropfenweise zu den Zellen gegeben, vorsichtig geschwenkt und für 6h bei normalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400µl bzw. 125µl Kompletmedium. Die Konzentration der siRNA betrug im Endvolumen 50nM (375ng). Nach 32h erfolgte die Stimulation der differenzierten Makrophagen mit poly I:C (Polyriboinosinic Polyribocytidylic Acid; 500µg/ml) für 16h. Danach wurden die transfizierten Zellen aus dem 24-Well-Ansatz entweder für die Protein- oder die RNA-Analyse aufgeschlossen (siehe 3.2.5. und 3.2.6) und die Zellen des 96-Well-Ansatzes in den BRDU-Assay (siehe 3.2.4.16) eingesetzt.

3.2.4.13 Transfektion und Stimulation von HAOEC-Zellen

Die HAOEC-Zellen wurden in Passage 1-6 mit einer Konzentration von 6×10^4 Zellen/100 μ l/Well in eine sterile 12-Well-Plate bzw. von 2×10^4 Zellen/50 μ l/Well in eine 96-Well-Plate ausgesät. Für die Transfektion mit HiPerFect Transfektionsreagenz und TRIF- bzw. Kontroll-siRNA wurde je siRNA folgender Ansatz hergestellt:

Tabelle 12: Transfektionsansatz für HAOEC-Zellen

	Pro 12 Well	Pro 96 Well
Zellzahl	6×10^5	$7,5 \times 10^3$
Hungermedium	100 μ l	22.75 μ l
HiPerFect Transfektionsreagenz	3 μ l	0,75 μ l
siRNA (2 μ M)	4,5 μ l	1,5 μ l

Jeder Transfektionsansatz wurde für 5-10 min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert. Danach wurden 100 μ l bzw. 25 μ l der Lösung tropfenweise zu den Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Die Konzentration der siRNA betrug im Endvolumen 15nM (112,5ng). Nach 32h erfolgte die Stimulation der HAOECs mit poly I:C (500 μ g/ml) für 16h. Danach wurden die transfizierten Zellen aus dem 12-Well-Ansatz entweder für die Protein- oder die RNA-Analyse aufgeschlossen (siehe 3.2.5 und 3.2.6) und die Zellen des 96-Well-Ansatzes in den BRDU-Assay (siehe 3.2.4.16) eingesetzt.

3.2.4.14 Transfektion und Stimulation neonataler Ratten-Kardiomyozyten

Für die Transfektion der neonatalen Kardiomyozyten wurden diese direkt mit einer Konzentration von 6×10^5 Zellen/Well in eine sterile 6-Well-Platte bzw. von $7,5 \times 10^3$ Zellen/Well in eine 96-Well-Plate ausgesät. Nach einer 48h Adhärenzzeit wurde ein Mediumwechsel mit 2,3ml bzw. 175µl F-10 Medium durchgeführt und dann transfiziert. Für die Transfektion mit HiPerFect Transfektionsreagenz und TRIF- bzw. Kontroll-siRNA wurde je siRNA folgender Ansatz hergestellt:

Tabelle 13: Transfektionsansatz für neonatale Ratten-Kardiomyozyten

	Pro 6 Well	Pro 96 Well
Zellzahl	6×10^5	$7,5 \times 10^3$
Hungermedium	100µl	23µl
HiPerFect Transfektionsreagenz	12µl	1µl
siRNA (20µM)	1,2µl	0,1µl

Jeder Transfektionsansatz wurde für 5-10 min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert. Danach wurden 100µl bzw. 25µl der Lösung tropfenweise zu den Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Die Konzentration der siRNA betrug im Endvolumen 10nM (75ng). Nach 32h erfolgte die Stimulation der Kardiomyozyten mit poly I:C (500µg/ml) für 16h. Danach wurden die transfizierten Zellen aus dem 6-Well-Ansatz entweder für die Protein- oder die RNA-Analyse aufgeschlossen (siehe 3.2.5 und 3.2.6) und die Zellen des 96-Well-Ansatzes in den BRDU-Assay (siehe 3.2.4.16) eingesetzt.

3.2.4.15 Transfektion und Stimulation neonataler Ratten-Fibroblasten

Für die Transfektion der neonatalen Fibroblasten wurden die Zellen in Passage 3 mit einer Konzentration von 6×10^5 Zellen/3ml/Well in eine sterile 6-Well-Plate bzw. von 1×10^4 Zellen/175µl/Well in eine 96-Well-Plate ausgesät. Nach einer 16h Adhärenzzeit wurde ohne Mediumwechsel direkt transfiziert. Für die Transfektion mit HiPerFect Transfektionsreagenz und TRIF- bzw. Kontroll-siRNA wurde je siRNA folgender Ansatz hergestellt:

Tabelle 14: Transfektionsansatz für neonatale Ratten-Fibroblasten

	Pro 6 Well	Pro 96 Well
Zellzahl	6x10 ⁵	7,5x10 ³
Hungermedium	10µl	23µl
HiPerFect Transfektionsreagenz	12µl	1µl
siRNA (20µM)	1,2µl	0,1µl

Jeder Transfektionsansatz wurde für 5-10 min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert. Danach wurden 100µl bzw. 25µl der Lösung tropfenweise zu den Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Die Konzentration der siRNA betrug im Endvolumen 10nM (75ng). Nach 32h erfolgte die Stimulation der Fibroblasten mit poly I:C (500µg/ml) für 16h. Danach wurden die transfizierten Zellen aus dem 6-Well-Ansatz entweder für die Protein- oder die RNA-Analyse aufgeschlossen (siehe 3.2.5. und 3.2.6) und die Zellen des 96-Well-Ansatzes in den BrdU-Assay (siehe 3.2.4.16) eingesetzt.

3.2.4.16 BrdU-Assay

Für die Bestimmung der Proliferationsrate wurden im Vorfeld transfizierte THP1-, HAOEC-Zellen sowie neonatale Ratten-Kardiomyozyten und –Fibroblasten in den Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche) eingebracht. Das Prinzip dieses ELISAs beruht auf der Bestimmung der BrdU-Menge via Chemilumineszenz. Dabei inkorporiert BrdU anstatt Thymidin bei der Zellteilung in die DNA, welches dann kolorimetrisch nachgewiesen wird.

Die Abarbeitung erfolgte gemäß den Vorschriften des Herstellers, wobei die Zellen für 3 Stunden mit BrdU inkubiert wurden. Die Messung erfolgte nach 30 min ohne Abstoppen bei 370nm und 492nm als Referenzwellenlänge.

3.2.5 RNA-Techniken**3.2.5.1 RNA-Extraktion****3.2.5.1.1 RNA-Extraktion aus dem Myokard**

Von den bei -80°C aufbewahrten Myokardabschnitten wurde zunächst ein ca. 3x3 mm großes Stück auf Trockeneis abgetrennt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200µl peqGOLD RNA Pure (Peqlab Biotechnology, Germany) erfolgte zunächst ein mechanischer Gewebeaufschluss mithilfe eines Potter-Homogenisators. Danach wurden mit peqGOLD RNA Pure auf 1000µl aufgefüllt und die Gesamt-RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde zum Schluss in 70µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die photometrische Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte direkt im Anschluss durch Messung der OD₂₆₀ sowie OD₂₈₀ gegen H₂O_{dest} am Nanodrop. (Thermo Scientific, Nidderau). Die RNA wurde bis zu ihrer Weiterbearbeitung bei -80°C gelagert.

3.2.5.1.2 RNA-Extraktion aus isolierten Zellen (neonatale Ratten-Kardiomyozyten und –Fibroblasten, THP1, HAoEC)

Zur RNA-Isolation wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Danach erfolgte die Isolation der RNA mithilfe des Absolutely RNA Microprep Kits (Stratagene, La Jolla, USA). Die Zellen wurden in 100µl Lysepuffer aufgenommen und nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde zum Schluss in 30µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die photometrische

Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte direkt im Anschluss durch Messung der OD₂₆₀, sowie OD₂₈₀ gegen H₂O_{dest} am Nanodrop. (Thermo Scientific, Nidderau). Die RNA wurde bis zu ihrer Weiterbearbeitung bei -80°C gelagert.

3.2.5.1.3 RNA-Extraktion aus mononukleären Zellen der Milz

Nach der LPS-Stimulation der mononukleären Zellen wurde der Überstand samt der nicht adhären Zellen abgehoben. Der Überstand wurde in ein 50 ml Falcon überführt und für 5 min bei 200g (1000rpm) zentrifugiert. Ca. 2ml Überstand wurden für eventuelle Fragestellungen bei -80°C weggefroren. Der restliche Überstand wurde gänzlich entfernt und die sedierten Zellen (ÜZ, Überstand-Zellen) in 1ml peqGOLD RNA Pure resuspendiert und bei -80°C weggefroren. Die adhären Zellen (Makrophagen) wurden ebenfalls in 1 ml peqGOLD RNA Pure resuspendiert und die Gesamt-RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde zum Schluss in 70µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die photometrische Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte direkt im Anschluss durch Messung der OD₂₆₀ sowie OD₂₈₀ gegen H₂O_{dest} am Nanodrop. (Thermo Scientific, Nidderau). Die RNA wurde bis zu ihrer Weiterbearbeitung bei -80°C gelagert.

Material und Methoden

3.2.5.2 cDNA-Synthese/Reverse Transkription von mRNA

Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits der Firma Applied Biosystems. Es wurde, wenn möglich, 1 µg RNA zur reversen Transkription eingesetzt (Reaktionsansatz und Cycle-Bedingungen siehe Tabelle 15, Tabelle 16).

Tabelle 15: Zusammensetzung eines 20 µl Ansatzes zur reversen Transkription von mRNA

Komponente	Volumen/Reaktion
10x RT Puffer	2,0 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10x RT Random Primer	2,0 µl
Multi Scribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl
Nuklease-freies Wasser	3,2 µl
mRNA (unverdünnt oder verdünnt mit nukleasefreiem Wasser)	10 µl (1 µg)

Tabelle 16: Cycle-Bedingungen zur reversen Transkription der mRNA

Schritt	Temperatur	Zeit
1	25°C	10 min
2	37°C	120 min
3	85°C	5 min
4	4°C	∞

3.2.5.3 cDNA-Synthese/Reverse Transkription von microRNA

Die cDNA-Synthese aus microRNA erfolgte unter Verwendung des TaqMan®MicroRNA Reverse Transcription Kit sowie dem RT-Primer aus dem Target-spezifischen TaqMan®MicroRNA Assay der Firma Applied Biosystems aus dem RNA-Gesamt-Isolat. Es wurde jeweils 5µl RNA zur reversen Transkription eingesetzt (Reaktionsansatz und Cycle-Bedingungen siehe Tabelle 17, Tabelle 18).

Tabelle 17: Zusammensetzung eines 15µl Ansatzes zur reversen Transkription von mRNA

Komponente	Volumen/Reaktion
10xRT Puffer	1,5 µl
dNTP Mix (100mM)	0,15 µl
RT-Primer (MicroRNA-spezifisch)	3,0 µl
Multi Scribe™RT Enzym (50U/µl)	1,0 µl
RNAse Inhibitor (20U/µl)	0,19 µl
Nukleasefreies Wasser	4,16 µl
RNA	5 µl

Tabelle 18: Cycle-Bedingungen zur reversen Transkription der microRNA

Schritt	Temperatur	Zeit
1	16°C	30 min
2	42°C	30 min
3	85°C	5 min
4	4°C	∞

3.2.5.4 Real-Time-PCR

Bei der quantitativen Real-Time-PCR (RT-PCR) handelt es sich um ein PCR-Prinzip, welches direkt die Quantifizierung der Amplifikate ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt durch die Echtzeitmessung („Real-Time“) von Fluoreszenzemissionen. Die Fluoreszenz stammt von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (Sybr Green) oder Fluoreszenz markierten Hybridisierungssonden (TaqMan®-Sonden), die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit detektiert werden können. Die Menge der Fluoreszenz korreliert mit der Menge des Amplifikats. Um die Fluoreszenzemission zu Beginn der exponentiellen Phase messen zu können, wird ein Schwellenwert („Threshold Cycle“, CT-Wert) gesetzt, der die Zyklenzahl beschreibt, bei welcher die emittierte Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Hierbei korreliert der erste signifikante Anstieg des PCR-Produkts mit der initialen Menge der Target-DNA. Die Anzahl der Template-Kopien verhält sich umgekehrt proportional zur Höhe des CT-Werts.

Jede untersuchte Probe wurde als Duplikat aufgetragen und der CT-Wert durch Mittelwertberechnung der Duplikate ermittelt. Um eine quantitative Aussage über die Target-Gen-Expression treffen zu können, wurde diese gegen die Expression eines Referenzgenes („Housekeeping Gene“), verrechnet. Als Kontaminationskontrolle wurde bei jedem PCR-Ansatz eine H₂O-Probe (Wasser statt cDNA) mitgeführt.

Zur Ermittlung von Expressionsunterschieden erfolgte die relative Quantifizierung der mit Hilfe einer Standardkurve und 18s als Referenzgen (siehe 3.2.5.4.3) und für microRNA mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode und RNU6b als Referenzgen (siehe 3.2.5.4.4).

3.2.5.4.1 Quantitative Real-Time-PCR-Analysen mit Sybr®Green

Alle Real-Time-PCRs für Genexpressionsprofile von mRNA wurde unter Verwendung des Sybr Green-Methode, also mit interkalierendem Fluorochrom, durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass keine spezifischen Sonden, sondern nur ein Target-spezifischer Primer benötigt wird. Der Nachweis wird über die Menge des während der Amplifikation in den DNA-Strang eingebauten SybrGreens geführt. Somit ist diese Methode eine kostengünstige und ubiquitär einsetzbare Variante der Real-Time-PCR. Da diese Methode aber nicht hoch spezifisch ist, empfiehlt es sich immer eine Schmelzkurve an die eigentliche PCR anzuhängen. Die Schmelzkurve gibt Auskunft bei welcher Temperatur sich die DNA-Doppelstränge voneinander

Material und Methoden

lösen. Die Temperatur, bei der 50% der Basenpaare aufgebrochen sind – also 50% der Duplexe denaturiert vorliegen – wird als Schmelztemperatur bezeichnet. Aufgrund des Verlaufs der Standardkurve lässt sich eine Aussage über die Spezifität der PCR machen: Eine spezifische PCR zeigt nur einen Peak in der Schmelzkurve. Wohingegen mehrere Peaks auf eine unspezifische Bindung, also mehrere verschieden PCR-Produkte, des Primers hinweisen.

Das Mastermix wurde wie in Tabelle beschrieben pipettiert. Dazu wurde das SybrGreen-Mastermix (KAPA SYBR FAST Universal) von der Firma Peqlab, Erlangen und PCR-Primer der Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg (siehe 3.1.4.1, Tabelle 3) verwendet. Die cDNA wurde in der Regel 1:10, für 18s 1:100 verdünnt und in einer Konzentration von 15—30ng/μl eingesetzt.

Tabelle 19: Zusammensetzung eines 20μl Ansatzes für die SybrGreen Real-Time-PCR

Komponente	Volumen/Reaktion
Mastermix	7 μl
Primer forward (5μM)	0,5 μl
Primer reverse (5μM)	0,5 μl
H ₂ O _{dest}	9,0 μl
cDNA	3 μl

Tabelle 20: Cycle-Bedingungen für die Sybr Green Real-Time-PCR

	Temperatur	Zeit
Hold	95°C	10 min
Cycle (40x)	95°C	1 sek
	60°C	20 sek

3.2.5.4.2 Quantitative Real-Time-PCR unter Verwendung von TaqMan®-Sonden

Das TaqMan®-PCR-Verfahren beschreibt ein quantitatives RT-PCR-Verfahren unter Ausnutzung des „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET). Hierbei wird eine sequenzspezifische Sonde verwendet, die an ihrem 5'-Ende mit einem Quencher, d.h. dem Akzeptor-Fluorochrom und an ihrem 3'-Ende mit einem Reporter, d.h. dem Rezeptor-Fluorochrom markiert wird. Bei Bestrahlung überträgt das angeregte Rezeptor-Fluorophor der intakten TaqMan®-Sonde die Energie auf den nahegelegenen Quencher, anstatt Fluoreszenz zu emittieren. Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang und die Reporter-Fluoreszenz bleibt weiterhin unterdrückt. Repliziert die Polymerase nun ein Template mit der gebundenen Sonde, spaltet ihre 5'-3'-Exonuclease-Aktivität das 5'-Ende der Sonde und somit das Rezeptor-Fluorochrom ab. Dessen Fluoreszenz wird nun nicht mehr durch den Quencher unterdrückt und die Emission kann am Ende der Elongation jedes Zyklus detektiert werden. Da das Abspalten des Quenchers nur nach Hybridisierung der Sonde an die Target-Sequenz erfolgt, zeichnet sich diese Methode durch eine hohe Spezifität aus.

Diese Methode wurde bei der Expressionsbestimmung von microRNA aus Myokard verwendet. Der TaqMan®-PCR-Ansatz wurde, wie in Tabelle 23 beschrieben, pipettiert. Reagenzien und verwendete Sonden (TaqMan®Small RNA Assay) wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen (siehe 3.1.4, Tabelle 4, Tabelle 6).

Tabelle 21: Zusammensetzung eines 20µl Ansatzes für die TaqMan® Real-Time-PCR

Komponente	Volumen/Reaktion
TaqMan®Small RNA Assay	1 µl
cDNA	1,33 µl
TaqMan®Universal PCR Master Mix II (2x), no UNG	10 µl
H ₂ O _{dest}	7,67 µl

Tabelle 22: Cycle-Bedingungen für die TaqMan® Real-Time-PCR

	Temperatur	Zeit
Hold	95°C	10 min
Cycle (40x)	95°C	15 sek
	60°C	1 min

3.2.5.4.3 Relative Quantifizierung der Genexpression mithilfe einer Standardkurve

Bei der relativen Quantifizierung mittels Standardkurve müssen bei jedem Lauf Proben einer Standardreihe mitgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu die zu untersuchenden Proben-cDNAs gepoolt und aus diesem Pool eine Verdünnungsreihe hergestellt. Für die Standardreihe der Target-Gene wurde die jeweils 1:1-Verdünnung durchgeführt (= 100; 50, 25; 12,5; 6,25), für 18s eine 1:10-Verdünnung (100, 10; 1; 0,1; 0,01). Die TaqMan®-Software errechnet aus dem CT-Werten dieser Proben eine Standardgerade. Bei optimalen PCR-Bedingungen (= Amplifikationseffizienz von 100%) hat diese Gerade eine Steigung von -3,3 und einen R^2 -Wert von 1. Die relative Menge der untersuchten Proben wird dann aufgrund dieser Standardkurve direkt von der Geräte-Software berechnet. Wobei folgende Gleichung zugrunde liegt:

$$\text{Relative Menge (Target-Gen)} = \text{Steigung} * \text{CT-Wert (Target-Gen)} + y\text{-Achsenabschnitt}$$

Die so ermittelten Werte für das Target-Gen wurden durch den Wert des Referenz-Gens derselben Probe dividiert.

3.2.5.4.4 Relative Quantifizierung der Genexpression nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode

Der CT-Wert ist als die Zyklenzahl definiert, bei welcher die emittierte Fluoreszenz der Amplifikats erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Bei Anwendung der $\Delta\Delta CT$ -Methode zur Quantifizierung der PCR-Amplifikate wird zunächst unter Verwendung nachstehender Gleichung der ΔCT -Wert kalkuliert, d.h. die Expression des Target-Gens gegen die Expression des Referenzgens normiert.

$$\Delta CT = CT (Target-Gen) - CT (Referenzgen)$$

Der ΔCT -Wert wird für jede zu quantifizierende Probe berechnet. Um relative Expressionsunterschiede des Target-Gens zwischen unterschiedlichen Behandlungsgruppen zu ermitteln, muss die relative Genexpression, d.h. der ΔCT -Wert einer der untersuchten Gruppen als „Baseline“ bzw. als Kontrolle gewählt werden und die Genexpression, d.h. der ΔCT -Wert in den übrigen Gruppen mittels nachfolgender Gleichung relativ zu dieser berechnet werden:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (Behandlungsgruppe) - \Delta CT (Kontrolle)$$

Um nun die n-fache Expression des Target-Gens in den Behandlungsgruppen in Relation zur Genexpression in der Kontrolle zu kalkulieren, werden im letzten Schritt der relativen Quantifizierung die errechneten $\Delta\Delta CT$ -Werte mithilfe nachstehender Gleichung in absolute Werte umgerechnet:

$$n\text{-fache Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.2.6 Proteintechniken

3.2.6.1 Proteinextraktion und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinbestimmung müssen die Proteine erst aus den verschiedenen Materialien aufgeschlossen werden, erst dann können die Proteine näher charakterisiert werden.

3.2.6.1.1 Proteinextraktion aus dem Myokard

Zur Proteinbestimmung aus tierischem Gewebe muss zunächst ein Aufschluss des Gewebes erfolgen. Hierzu wurden ein ca. 150µg großes Gewebestück der bei -80°C aufbewahrten Herzen mit 500µl hypotonen Lysepuffer gepottert. Falls das Lysat noch zu viskös war, wurden noch 200µl Lysepuffer hinzugefügt und nochmals durchmischt. Das Homogenisat wurde anschließend eine Minute bei 2000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry und eine Western Blot-Analyse durchgeführt und das Lysat bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.6.1.2 Proteinextraktion aus isolierten Zellen (neonatale Ratten-Kardiomyozyten und –Fibroblasten, THP1, HAoEC)

Zur Proteinisolation wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100µl Proteinlysepuffer wurden die Zellen vom Boden abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach sorgfältiger Homogenisation des Lysats wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry und eine Western Blot-Analyse durchgeführt und das Lysat bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.6.1.3 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteine besitzen aufgrund der aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Zur Messung der Proteinkonzentration wurden je 2µl des Gesamtzell-Lysats im Verhältnis 1:20 mit H₂O_{dest} verdünnt, mit den Reagenzien A und B (DCTM Protein Assay Reagent, Bio-Rad, München) laut Herstellerangaben versetzt und die

OD₂₈₀ nach 15-minütiger Inkubation bei RT photometrisch nach Lowry bestimmt. Als Referenzwert diente mit den Reagenzien versetztes H₂O_{dest.}

3.2.6.1.4 Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte mithilfe der Western Blot-Methode. Sie stellt eine sehr sensitive und spezifische Methode zum Proteinnachweis dar. Dabei werden die Proteine zuerst mithilfe der Gelelektrophorese (siehe 3.2.6.2) getrennt. Unter Gelelektrophorese versteht man generell die Wanderung von positiv oder negativ geladenen Molekülen im elektrischen Feld, in einer Trägermatrix aus Gel, die der Analyse von Makromolekülen dient und eine schnelle Molekulargewichtsbestimmung ermöglicht. Polyacrylamid-Gele entstehen durch die Polymerisation von Acrylamid und der Vernetzung der linearen Polymere durch N,N'-Methylenbisacrylamid.

Die Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmen die Porengröße des Gels und ihre Polymerisation wird durch APS initiiert. Als Katalysator dient dabei TEMED. Bei der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine durch SDS denaturiert und es bilden sich negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit einem konstantem Masse zu Ladungsverhältnis. Diese Komplexe werden während ihrer Wanderung im elektrischen Feld durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylmatrix nach ihrem Stokes-Radius und somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierbei ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Mobilität des Polypeptids.

Danach folgte der eigentliche Western Blot, bei dem die Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung auf einer PVDF-Membran immobilisiert werden. Die Proteine gehen hydrophobe Wechselwirkungen mit der beschichteten Membran ein und werden so unter Erhaltung des elektrophoretischen Auftrennungsmusters und ihrer Aktivität sowie Reaktivität auf dieser immobilisiert, wodurch sie sowohl quantitativ als auch qualitativ mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können.

Im Anschluss erfolgte die Detektion und Visualisierung durch Immunoblot. Dabei handelt es sich um eine Chemilumineszenz basierende Antikörper-Detektion mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörper. Die Peroxidase katalysiert die Reduktion von H₂O₂, sowie die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form,

woraus eine Lichtemission der Wellenlänge $\lambda = 428\text{nm}$ resultiert. Diese Emission kann nun mithilfe eines blaulichtempfindlichen ECLTM-Films (GE Healthcare, Freiburg) dokumentiert und densitometrisch quantifiziert werden.

3.2.6.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die zu untersuchenden Proteine wiesen alle ein Molekulargewicht auf, das eine geeignete Auftrennung in einem 10%igen Trenngel (siehe Tabelle 23) erwarten ließ. Im Versuch wurden jeweils 50 bis 100 μg Protein mit 5x Protein-Ladepuffer (siehe 3.1.3) versetzt, 3 min bei 95°C gekocht und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Anlegen einer Stromstärke von 30mA erfolgte die Wanderung der Proben durchs Sammelgel von der Anode zur Kathode. Die Auftrennung erfolgte so lange bis die erste Bande des Größenstandards, (Pre-Stained SDS-PAGE Standards, Low Range, BioRad, München, siehe Abbildung 13) das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Gelkomponenten	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
1 M Tris-HCl (pH 6,8)		250 μl
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	2000 μl	
30% Acrylamid/Bis Solution 29:1 (3,3% C) Bio-Rad	2600 μl	330 μl
10% SDS	75 μl	20 μl
H ₂ O _{dest}	3000 μl	4000 μl
10% APS	75 μl	20 μl
TEMED	10 μl	5 μl

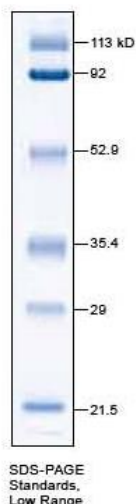


Abbildung 13: SDS-PAGE Größenstandards

3.2.6.2.1 Western Blot (Immuno Blot)

Die in der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden über 45min im Semi-Dry-Blot-Verfahren durch ein senkrecht zum SDS-Gel gerichtetes elektrisches Feld (200mA) auf eine PVDF-Trägermembran transferiert.

3.2.6.2.2 Immundetektion

Die PVDF-Membran wurde nach dem Blotting für 1h in 5% Magermilch in PBS/Tween geblockt, um unspezifische Bindungen der nachfolgend eingesetzten Antikörper zu unterbinden. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe 3.1.5, Tabelle 5) erfolgt in 5ml 1%iger Magermilch-Lösung in PBS-Tween über Nacht in einem 50ml Falcon-Röhrchen bei 4°C auf einem Schüttler. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Membran 2 mal 5 min und 2 mal 10min mit PBS-Tween gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (siehe 3.1.5, Tabelle 6), der in 20ml PBS-Tween verdünnt wurde, erfolgte für 20 min bei RT auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran erneut 2 mal 5min und 2 mal 10min mit PBS/T gewaschen. Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und ermöglichten so eine Visualisierung der Protein-Banden mithilfe des ECLTM-Kits. Hierzu wurde die Membran 1min in den im Verhältnis 1:1 gemischten ECLTM-Detektions-Reagenzien 1 und 2 geschwenkt, um anschließend den Film für die jeweils indizierte Zeit zu exponieren und schließlich maschinell zu entwickeln und zu fixieren.

3.2.6.2.3 Densitometrische Quantifizierung

Zur Quantifizierung immunologisch detektierter Proteine wurden die ECLTM-Filme eingescannt. Die Ermittlung des Proteinlevels, d.h. der optischen Dichte der jeweiligen Proteinbanden erfolgte mithilfe der Computersoftware Labworks 3.0. Zur Quantifizierung der Proteine wurde die gemessene optische Dichte des untersuchten Proteins einer bestimmten Probe jeweils durch die optische Dichte des als Referenz gewählten Proteins GAPDH der betreffenden Probe dividiert und gegen die relative Expression des Proteins in der Kontrollgruppe normalisiert.

3.2.6.3 Hydroxyprolin Assay

Mithilfe des QuickZyme Hydroxyproline Assays (QuickZyme, Leiden, NL) wird der Hydroxyprolin Gehalt von Gewebe bestimmt. Hydroxyprolin ist eine non-proteinogene Aminosäure und kommt im Wesentlichen nur im Kollagen und im Elastin vor. Hier stellt es 14% bzw. 2% der Aminosäurereste und dient somit als direkter Nachweis für die Kollagenmenge im Gewebe.

Nach Hydrolyse Myokards (100mg Gewebe/ml), mit 6M HCl bei 95°C für 20h wurde nach Abkühlen auf Eis das Lysat bei 13 000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 1:1 Verdünnung mit 4M HCl wurden 35µl Probe in den eigentlichen Assay (ELISA) eingebracht. Die Abarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Messung des Chromogens wurde bei 570nm durchgeführt und die Umrechnung in µM Hydroxyproline wurde mithilfe einer beim ELISA mitgeführten Standardgerade umgesetzt. Die Proben für die Standardgerade wurden aus einer vom Hersteller mitgelieferten und laut Anleitung verdünnten Stocklösung hergestellt.

3.2.7 Histologie

3.2.7.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Wie unter 3.2.1.3 beschrieben, wurden mittventrikuläre Gewebescheiben in 4% igem Paraformaldehyd fixiert. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Gewebestücke aus dem Paraformaldehyd entnommen, jeweils in eine Einbettkassette (Tissue-Tek®, Sakura) überführt und über Nacht unter fließendem Wasser gespült. Als nächster Arbeitsschritt schloss sich die Dehydration an, um das Wasser aus dem Gewebe durch Alkohol und letztendlich durch Paraffin zu ersetzen. Die Entwässerung erfolgte über Nacht in einer automatischen Histokinette.

Am Folgetag wurden die Gewebe dem Paraffinbad entnommen, in Metallförmchen gelegt, mit flüssigem Paraffin übergossen und mit dem Unterteil der Einbettkassette zusammen ausgeblockt. Nach vollständigem Erkalten der Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Mikrotoms (Leica, Wetzlar) 3-5µm dicke Schnitte im Nassschneideverfahren gefertigt, diese wurden im Wasserbad auf Objektträger (Microscope Slides, VWR; Polysine® Slides, Thermo Scientific) gezogen und für mindestens 24h im Inkubator bei 60°C getrocknet.

3.2.7.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung, die sich aus zwei Einzelfärbungen zusammensetzt, dient der mikroskopischen Differenzierung unterschiedlicher Strukturen eines Gewebeschnittes. Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen blau, unter anderem auch die Nuklei mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte endoplasmatische Retikulum. Alle acidophilen bzw. basischen (eosinophilen) Strukturen werden durch Eosin rot gefärbt. Das sind vor allem die Zytoplasmaproteine. Die Färbung von rosa/rotem Zytoplasma und blauen Zellkernen ermöglicht es die Zellgrenzen mikroskopisch zu erkennen und somit die Fläche der Zellen (hier: der Kardiomyozyten) mit einer geeigneten Computersoftware zu ermitteln. Die Querschnittsfläche wurde pro Versuchstier bei ca. 100 querschnittenen Zellen mit annähernd mittig gelegtem Nukleus bei 40-facher Vergrößerung bestimmt (LUCIA G® Software, Nikon, Düsseldorf). Hierbei wurde die Querschnittsfläche durch Umfahren der Zellmembran und Berechnung der umfahrenen Fläche ausgemessen.

Tabelle 24: Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

Substanz	Zeit
Rotihistol®	3 x 10 min
100% Isopropanol	2 min
90% Isopropanol	2 min
70% Isopropanol	2 min
H ₂ O _{dest}	5 min
Hämatoxylin nach Ehrlich	20 min
H ₂ O _{dest}	spülen
HCL-Alkohol	1 s
H ₂ O _{dest}	spülen
Fließend bläuen	15 min
H ₂ O _{dest}	spülen
Eosin	15 s
H ₂ O _{dest}	spülen
90% Isopropanol	2 min
100% Isopropanol	2 min
Rotihistol®	3 x 3 min
Luftblasenfreies Eindecken mit Entellan® (Merck, Darmstadt)	

3.2.7.3 Sirius Red Färbung von Paraffinschnitten

Der anionischen Farbstoff Sirius Red färbt aufgrund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Bindegewebe an. Große Fibrillen werden orange-rot, kleine Fibrillen hingegen grün gefärbt und das Zytoplasma erscheint gelb. Diese Färbung eignet sich als sehr sensitive Nachweismethode für Kollagen. Nach Aufnahme des gesamten Querschnitts in 10-facher Vergrößerung wurden aufgrund der deutlichen Farbunterscheidung der linksventrikuläre Kollagengehalt mithilfe der LUCIA G© Software (Nikon) bestimmt. Der prozentuale Kollagenanteil der Querschnittsfläche wurde mit folgender Gleichung berechnet.

$$\text{Kollagenanteil [\%]} = \text{Kardiomyozyten - Kollagen/Gesamtgewebefläche} * 100$$

Tabelle 25: Färbeprotokoll der Sirius Red-Färbung von Paraffinschnitten

Substanz	Zeit
Rotihistol®	3 x 10 min
100% Isopropanol	2 min
90% Isopropanol	2 min
70% Isopropanol	2 min
H ₂ O _{dest}	5 min
H ₂ O _{dest}	10 min
0,1% Sirius Red-Lösung	60 min
H ₂ O _{dest}	spülen
H ₂ O _{dest}	spülen
90% Isopropanol	2 min
100% Isopropanol	2 min
Rotihistol®	3 x 3 min
Luftblasenfreies Eindecken mit Entellan® (Merck, Darmstadt)	

3.2.7.4 Immunhistochemische Färbung

3.2.7.4.1 Grundprinzip

Die Immunfärbung diente der Identifizierung und Quantifizierung bestimmter Zelltypen im Myokard wie Kardiomyozyten, Endothelzellen, Makrophagen und T-Zellen. Dazu wurden Primärantikörper (siehe 3.1.6, Tabelle 7) verwendet, welche an spezifische Antigen-Epitope dieser Zelltypen binden. Die Detektion der Antigen/Antikörper-Bindung erfolgte jeweils mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper (siehe 3.1.6, Tabelle 7 und Tabelle 9). Aufgrund der individuellen Immunreaktivität der Zielantigene kamen zwei unterschiedliche Detektionsmethoden zum Einsatz: indirekte 2-Schritt-Methode für Antigene mit starker Immunreaktivität bzw. Streptavidin-Biotin-Methode für Antigene mit schwacher Immunreaktivität.

Um Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper mit den Gewebsantigenen auszuschließen, wurde als Negativkontrolle ein Schnitt nur mit Pufferlösung ohne Primärantikörper inkubiert und anschließend mit den anderen Schnitten weiter bearbeitet.

Durch Verwendung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern, Fitc (grün) oder Tritc (rot) war die gleichzeitige Detektion zweier Zelltypen auf einem Schnitt möglich. Bei der Doppelfärbung wurden in der Regel die Kardiomyozyten (Fitc) und der zweite zu beurteilende Zelltyp (Tritc) angefärbt. Dies erlaubte die Quantifizierung bzw. Lokalisation dieser Zelltypen im Verhältnis zu den Kardiomyozyten.

3.2.7.1.1 Vorbehandlung (Antigenretrieval)

Die Paraffinschnitte wurden zunächst durch 30-minütiges Erwärmen auf einer Heizplatte bei 70°C, dreimaliger 10-minütiger Inkubation in Rotihistol® und anschließender absteigender Alkoholreihe (2 x 5min ETOH absolut, 1 x 5min 85% EtOH, 1 x 5min 70% EtOH) entparaffiniert. Nach Waschen mit PBS-Tween von dreimal 5 Minuten erfolgte die Freilegung der Epitope (Retrieval) durch eine Hitzebehandlung mit Citraconiumanhydridpuffer. Dazu wurden die Schnitte in einer hitzestabilen Plastikküvette in 0,05% Citraconiumanhydrid, pH 7,4 für eine Stunde in einem 98°C heißem Wasserbad gekocht. Anschließend wurden die Objektträger für mindestens 30min bei RT abgekühlt.

3.2.7.1.2 Färbemethode

Bei allen Immunfärbungen wurde der Primärantikörper in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bei +4°C über Nacht (für mindestens 12 Stunden) und anschließend bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Sekundärantikörper. Alle Inkubationen mit Antikörpern und Reagenzien bei 37°C wurden in feuchten Kammern im Wasserbad durchgeführt. Zwischen jedem Inkubationsschritt und nach der letzten Inkubation wurden die Objektträger jeweils dreimal 5 Minuten mit PBS-Tween oder 4x SSC-Tween gewaschen. 4x SSC vermindert die Hintergrundfärbung und die nichtspezifische Antikörperbindungen in problematischen Fällen der Immunfärbung besser als andere Waschpuffer. So konnte im Gegensatz zu 1 x PBS bei schwacher Antigenreaktivität ein gutes Fluoreszenzsignal erreicht werden. Bei der Doppelfärbung wurden im Anschluss die gleichen Schritte mit dem zweiten Antikörper wiederholt. Nach Ende der Färbung(en) wurde tropfenweise DAPI Mounting Medium (Vectashield, Peterborough, UK) auf den Objektträger gegeben und dieser mit einem Deckglas versiegelt. Die Präparate wurden bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die Verdünnungen der Primär- und Sekundär-Antikörper sind in 3.1.6, Tabellen 9 bis 11 aufgeführt.

3.2.7.1.3 Indirekte Zwei-Schritt-Methode

Diese Methode wurde bei der Detektion von alpha- sarkomerischem Aktin (Kardiomyozyten) angewandt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde vor der Applikation des Primärantikörpers für 10min bei RT mit 4% BSA/4x SSC inkubiert. Anschließend wurde der in 4% BSA/4x SSC verdünnte Primärantikörper appliziert und, wie unter 3.2.7.1.2 beschrieben, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit dem entsprechenden Fitc-konjugierten Sekundärantikörper (anti-mouse-IgM-Fitc) eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Ebenso wurde diese Methode zum Nachweis des endothelspezifischen Podocalyxins angewandt. Hierbei wurde der Antikörper mit PBS-Tween verdünnt. Als Sekundärantikörper wurde anti-goat-IgG-Tritc verwendet und für 3 Stunden inkubiert.

3.2.7.1.4 Streptavidin-Biotin-Methode

Diese Methode fand Anwendungen bei der CD3- (T-Zellen) und F4/80- (Makrophagen) Immunfärbung. Der Primärantikörper wurde mit 1 x PBS-Tween verdünnt. Eine Blocklösung wurde aufgrund der geringen Immunreaktivität der Antigene nicht verwendet. Die Inkubation des Primärantikörpers wurde wie oben beschrieben ausgeführt. Am nächsten Tag wurden die Proben mit einem Biotin konjugiertem Sekundärantikörper für 2 Stunden bei 37°C und anschließend mit TRITC konjugiertem Streptavidin im Verhältnis 1:50 für 30min bei 37°C inkubiert.

3.2.7.1.5 Auswertung der Schnitte

Die Doppelfärbungen wurden verwendet, um die Anzahl der CD3-positiven T-Zellen oder der F4/80-positiven Makrophagen im Verhältnis zu den Kardiomyozyten bzw. zur Gesamtzellzahl pro mm² zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde ein Okular mit Rastermuster bei 100x Vergrößerung mit Ölimmersion eingesetzt und an 15 zufällig ausgewählten Stellen im Präparat alle fluoreszierende Zellen mit Zellkern sowie die Gesamtzahl an Zellkernen, die sich innerhalb der Grenzen des Rastermusters befanden, gezählt. Die Zelldichte wurde mit folgender Formel kalkuliert:

$$\text{Anzahl der Zellen pro mm}^2 = \frac{\text{Anzahl der Zellen in 15 Gesichtsfeldern}}{(0,00153664 \cdot 15)}$$

wobei 0,00153664 die Größe des Rastermusters widerspiegelt. Anschließend wurde aus den oben gewonnen Werte das Verhältnis der positiven Zellen zu den Kardiomyozyten kalkuliert.

4. Ergebnisse

4.1. Zeitliches Expressionsprofil MyD88-abhängiger und unabhängiger Zytokine nach Aortenligatur

In einem ersten Schritt wurde die maximale inflammatorische Aktivität im Herzen nach transaortaler Konstriktion bestimmt. Dazu wurde die Genexpression von unterschiedlichen Zytokinen zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach Aortenligatur in Wildtyp-Mäusen (C57BL/6J) gemessen. Dabei handelte es sich sowohl um MyD88-abhängige als auch –unabhängige Zytokine, deren relative mRNA-Expression zum Zeitpunkt 0,67, 3, 7 und 35 Tage nach OP determiniert wurde (Abb. 14A). Untersucht wurde die Expression von IL4, IL6, IL10, CCL2, CCL5, CCL11, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CX3CL1, TNF alpha. Die relative mRNA-Menge war zu den drei frühen Zeitpunkten sowohl bei den MyD88-unabhängigen sowie bei den MyD88-abhängigen Zytokinen mindestens verdoppelt bzw. teilweise sogar fast verzehnfacht im Vergleich zu den Sham-operierten Kontrollen (Abb. 14B + C). Am deutlichsten war der Anstieg zum Zeitpunkt 3 beziehungsweise 7 Tage nach OP. Fünf Wochen nach OP waren die Werte deutlich reduziert und teilweise wieder auf dem Niveau der Kontrolle. Für die weitere Versuchsplanung fokussierten wir uns auf Tag 7 und auf Tag 35 nach transaortaler Konstriktion. An Tag 7 kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten inflammatorischen Effekte nicht mehr als Folge der OP an sich auftreten, sondern aufgrund der Nachlasterhöhung. Tag 35 diente als Kontrolle, da zu diesem späten Zeitpunkt die linksventrikuläre Hypertrophie als manifestiert gelten kann. Des Weiteren wurde im Rahmen der Aufklärung des Einflusses der Inflammation für das kardiale Remodeling der Focus auf den MyD88-unabhängigen TLR3-abhängigen TRIF-Signalweg gelegt.

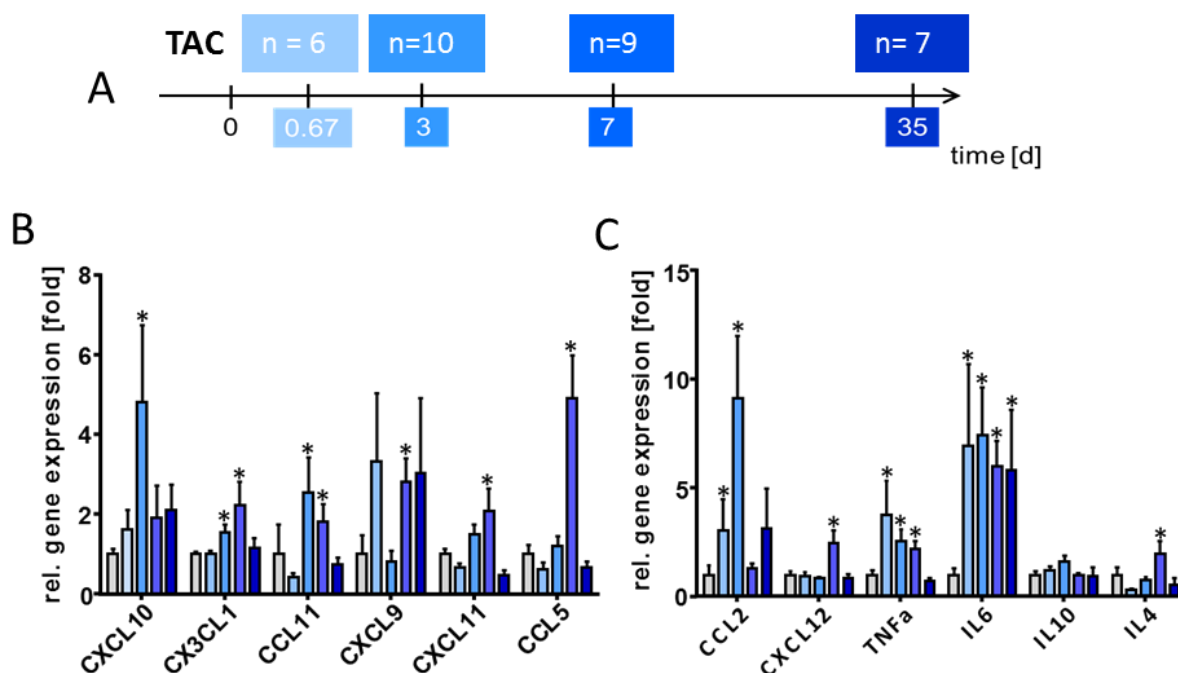


Abbildung 14: Die Genexpression von MyD88-abhängigen und –unabhängigen Zytokinen ist zu einem frühen Zeitpunkt nach Nachlasterhöhung im Myokard am höchsten

C57Bl/6J-Mäuse wurden einer Aortenligatur bzw. der entsprechenden Sham-OP unterzogen. Für die Erstellung eines Zeitprofils der Zytokinexpression erfolgte die Organentnahme zu vier verschiedenen Zeitpunkten: 16h, 3, 7 und 35 Tage nach Aortenligatur. Abb. A zeigt die Entnahmezeitpunkte nach Aortenligatur (TAC) (unten) sowie die Anzahl der verwendeten Tiere pro Gruppe (oben). Das mRNA-Zeitprofil der MyD88-abhängigen Zytokine ist in Abb. B dargestellt. Abb. C zeigt das identische Zeitprofil für die TRIF-abhängigen Zytokine. Die Expressionswerte der TAC-operierten Tiere wurden jeweils in Relation zu den Werten der Sham-operierten Tiere von d=0,67 gesetzt (grauer Balken) und die Signifikanz dazu berechnet. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

4.2. TRIF-Signalweg: Expression von TRIF und TRIF-abhängiger Gene 7 Tage nach Aortenligatur

Zur Klärung der Bedeutung von TRIF für das myokardiale Remodeling wurden im Folgenden Tierversuche mit TRIF defizienten Tiere (C57BL/6J-*Ticam1*^{Lps2}/J) und den korrespondierenden Wildtyptieren (C57BL/6J) durchgeführt. In den Grafiken sind die Werte der C57BL/6J-Tiere als blaue (hellblau=Sham, dunkelblau=TAC), und die Werte der TRIF^{-/-}-Tiere als rote (hellrot=Sham, dunkelrot=TAC) Balken dargestellt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der RNA- und Proteinanalysen sind als relative Werte dargestellt. Alle ermittelten Daten der unterschiedlichen Tier- bzw. Behandlungsgruppen wurden immer in Bezug auf die Gruppe der Sham-operierten Wildtypiere gesetzt. Somit ergibt sich für die Sham-operierte Kontrollgruppe immer ein Mittelwert von „1“.

Zuerst erfolgte die Darstellung der Expression von Genen des TRIF-Signalwegs. Nach Sham-OP war die Expression von TRIF-mRNA in den TRIF-defizienten Tieren offensichtlich reduziert aber nicht völlig verschwunden. Die Erhöhung der linksventrikulären Nachlast verstärkte den Expressionsunterschied aber merklich. So zeigten die TRIF-Tiere nach 7 Tagen eine signifikant geringere Expression von TRIF (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,10$; C57BL/6J TAC = $0,95 \pm 0,14$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $0,51 \pm 0,15$; TRIF^{-/-} TAC = $0,41 \pm 0,09$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ TAC vs. TAC} < 0,001$, Abbildung 15A). Genauso verhielt es sich mit der Expression des downstream von TRIF liegenden Interferon Regulatory Factors 3 (IRF3) Auch hier war die Expression nach TAC in den TRIF-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren reduziert (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,58$; C57BL/6J TAC = $0,69 \pm 0,14$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $0,71 \pm 0,24$; TRIF^{-/-} TAC = $0,33 \pm 0,18$; $p = \text{n.s.}$, Abbildung 15B). Viel prägnanter war der Effekt auf Proteinebene. Im Westernblot aus Herzgewebe wies die Kontrollgruppe nach TAC relativ gesehen eine Verdreifachung der IRF3-Proteinexpression auf, wohingegen es bei den TRIF ko-Tieren zu keinem Anstieg von IRF3 kam (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,17$; C57BL/6J TAC = $2,72 \pm 0,42$; $p < 0,001$; TRIF^{-/-} Sham = $0,39 \pm 0,11$; TRIF^{-/-} TAC = $0,51 \pm 0,12$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ TAC vs. TAC} < 0,01$, Abbildung 15C). Der knock down von TRIF wirkte sich auch auf die mRNA-Expression von Interferon beta (IFN β) aus. So zeigten diese Tiere einen geringeren Grundlevel als die Wildtypiere (C57BL/6J Sham = $1,0 \pm 0,14$; C57BL/6J TAC = $1,03 \pm 0,15$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $0,69 \pm 0,16$; TRIF^{-/-} TAC = $0,60 \pm 0,11$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ Sham vs. Sham} = \text{n.s.}$, Abbildung 15D). Eine Darstellung der TRIF-Proteinexpression im Westernblot war nicht möglich, da die TRIF-Proteinexpression insgesamt sehr niedrig war und eine densitometrische Auswertung deshalb kein verwertbares Ergebnis brachte.

Ergebnisse

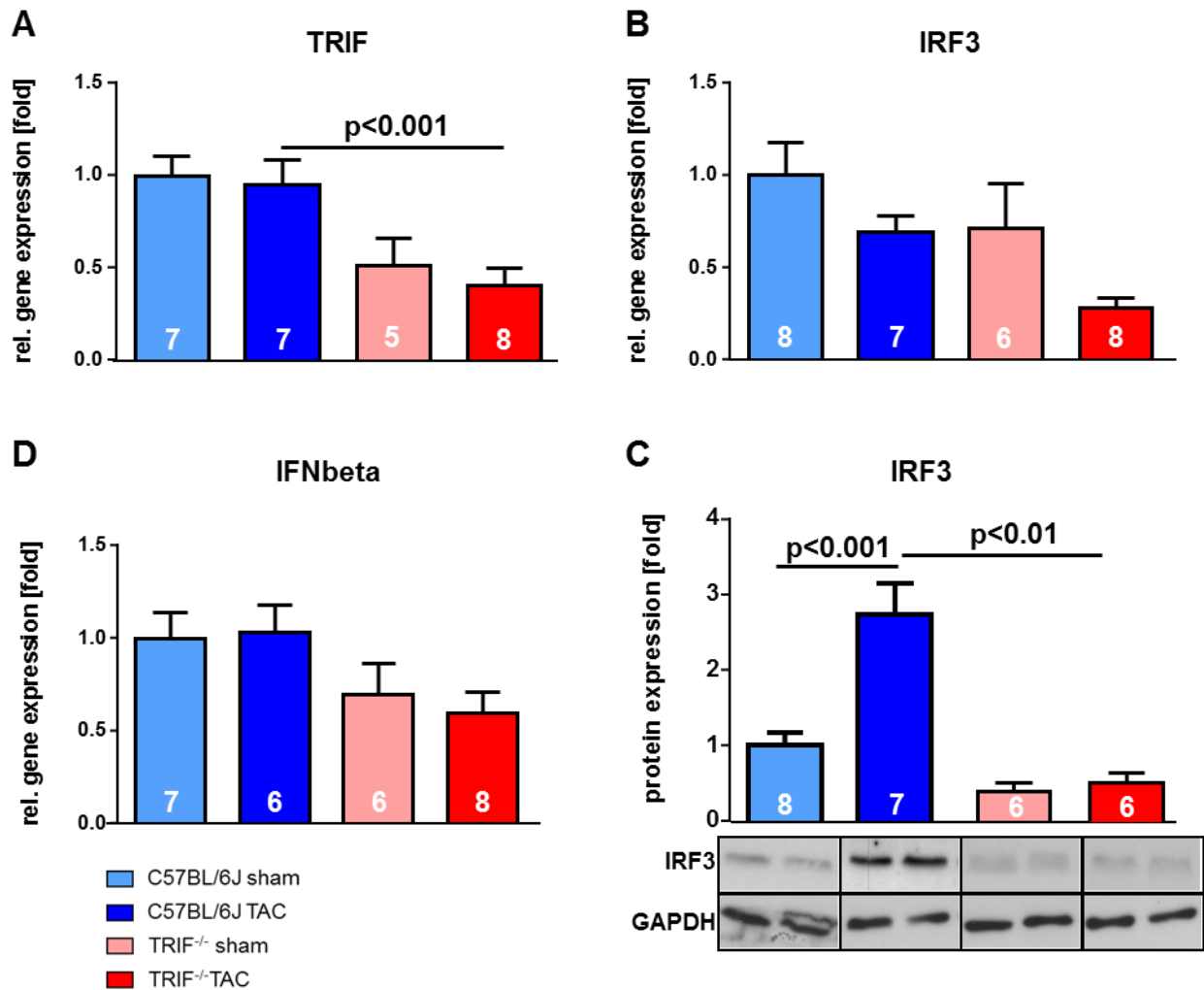


Abbildung 15: TRIF-defiziente Mäuse zeigen eine geringere Expression von TRIF, IRF3 und Interferon beta

Zur Überprüfung des TRIF-Defizienz und dessen Auswirkungen auf die TRIF-Signalkaskade wurde von C57BL/6J- und TRIF^{-/-}-Mäusen die myokardiale Genexpression von TRIF (A), IRF3 (B) und Interferon beta (D) ermittelt. Abb. C zeigt die Proteinexpression von IRF3. Die Darstellung erfolgte bei den mRNA-Analysen als relative Genexpression bezogen auf den normalisierten Wert der Sham-operierten C57BL/6J-Tiere. Als Referenzgen wurde 18s verwendet. Die Proteinexpression von IRF3 wurde gegen den Housekeeper GAPDH normalisiert. Es wurden pro Tier jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

Ergebnisse

4.3. Bestimmung der myokardialen Hypertrophie

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, in wie weit TRIF einen Einfluss auf das maladaptive Remodeling in Bezug auf das Entstehen einer Hypertrophie hat. Dazu wurde der kardiale Phänotyp der beiden Tiergruppen determiniert.

Die Bestimmung der Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio (Abbildung 16), deren Zunahme als typisches Merkmal des hypertrophen Phänotyps gilt, zeigte bereits an Tag 7 einen Anstieg bei den TAC-operierten Tieren beider Gruppen. Die Zunahme war in den Tiergruppen vergleichbar, wobei sie tendenziell in der WT-Gruppe etwas höher ausfiel. An Tag 35 war die Hypertrophie der TAC-Tiere zwar ausgeprägter, war aber auch hier in den Gruppen auf gleichem Niveau.

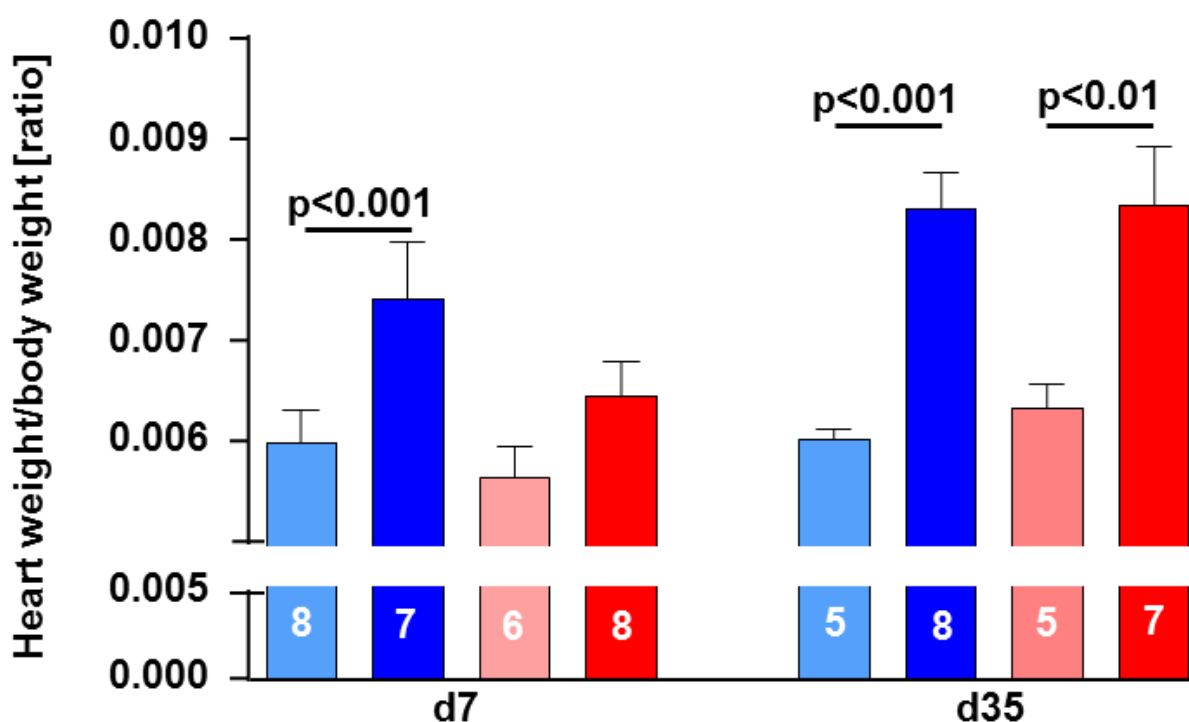


Abbildung 16: Nachlasterhöhung bewirkt eine vergleichbare Ausprägung morphologischer Hypertrophiemarker in beiden Tierstämmen

Das Maß der myokardialen Hypertrophie wurde über das Herzgewicht/Körpergewicht-Verhältnis bestimmt. Dazu wurde vor Organentnahme das Gesamtgewicht der Mäuse und im Anschluss direkt das Gewicht des frisch entnommenen Herzens bestimmt. Die Organentnahme erfolgte zu einem frühen Zeitpunkt (d7) und zu einem späten Zeitpunkt nach Nachlasterhöhung (d35). (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

4.3.1. Histologische Beurteilung des Myokards

Die Kardiomyozyten-Hypertrophie, d. h. eine Ausdehnung der Herzmuskelzelle, ist eine Folge (mal)adaptiver Antworten auf myokardialen Stress. Somit zählt die Vergrößerung der Kardiomyozyten auf zellulärer Ebene zu den aussagekräftigen Hypertrophie-Markern. Ein Ausbleiben der Herzgewichtszunahme schließt eine Hypertrophie der Herzmuskelzellen nicht aus, da sowohl kompensatorische Umbauprozesse der Herzwände als auch Faktoren wie die Induktion von Apoptose und/oder der kardialen Fibrose der Massenzunahme entgegen wirken.

Wie Abbildung 17 zeigt, setzte eine Vergrößerung der Kardiomyozytenquerschnittsfläche bereits früh nach transaortaler Konstriktion ein, sodass bereits am Tag 7 post OP vergrößerte Kardiomyozyten zu beobachten waren (C57BL/6J Sham:= $115,2 \pm 6,3 \mu\text{m}^2$; C57BL/6J TAC = $137,3 \pm 4,0 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$; TRIF^{-/-} Sham = $102,9 \pm 4,4 \mu\text{m}^2$; TRIF^{-/-} TAC = $134,1 \pm 7,6 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$, Abbildung 17A). Waren die Tiere über den längeren Zeitraum einer Nachlasterrhöhung (= 5 Wochen) ausgesetzt, führte dies zu einer markanten Vergrößerung der Kardiomyozyten (C57BL/6J Sham:= $110,2 \pm 5,2 \mu\text{m}^2$; C57BL/6J TAC = $188,6 \pm 11,9 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$; TRIF^{-/-} Sham = $99,8 \pm 4,0 \mu\text{m}^2$; TRIF^{-/-} TAC = $186,9 \pm 17,1 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$; $p < 0,001$ Abbildung 17A). Wie bei der Körpergewicht/Herzgewicht-Ratio unterschied sich die Ausprägung der kardiomyozytären Hypertrophie in den beiden Gruppen sowohl an Tag 7 als auch an Tag 35 nicht.

Ergebnisse

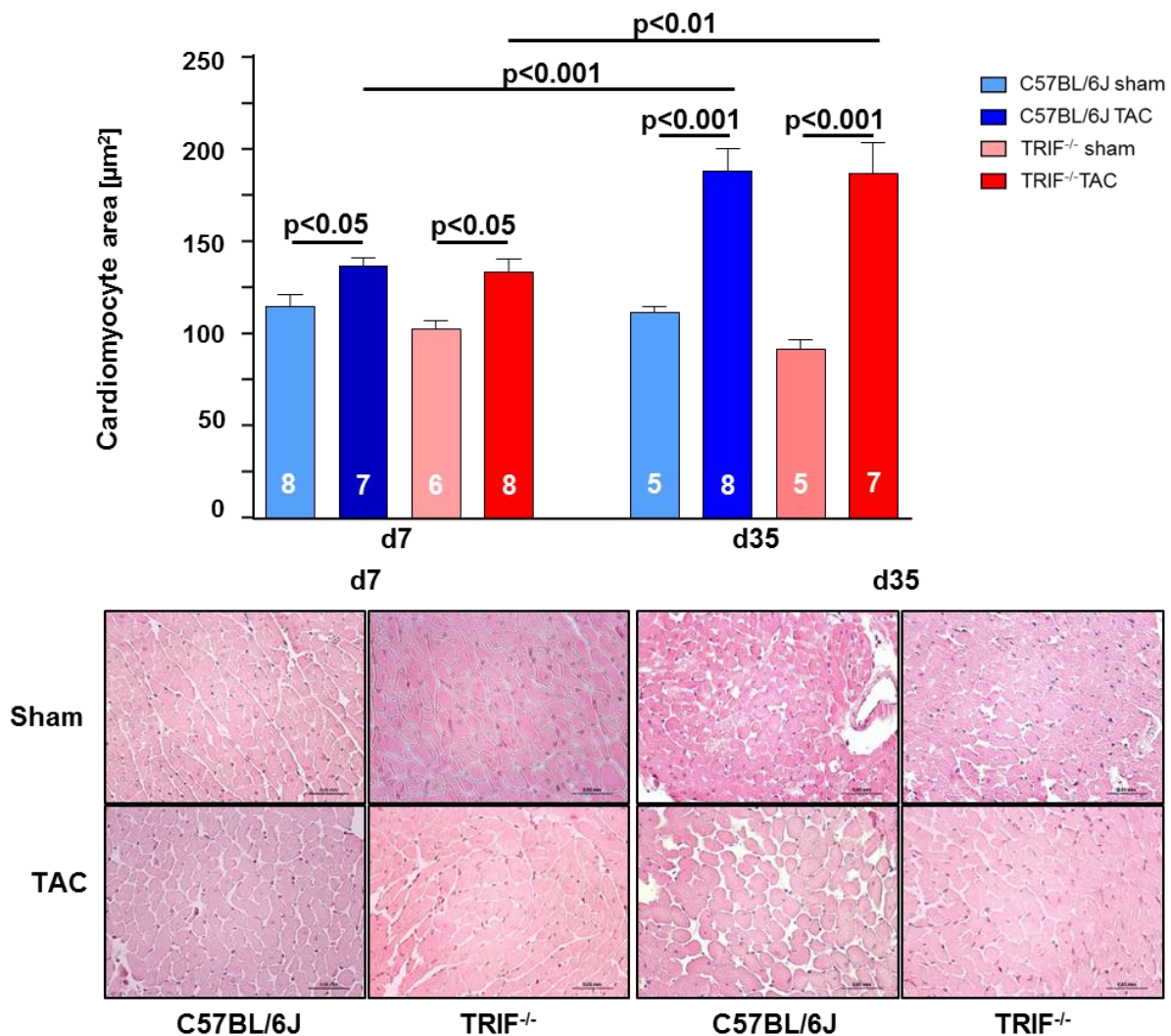


Abbildung 17: Nachlasterhöhung bewirkt vergleichbare Veränderungen der Kardiomyozytengröße in beiden Tierstämmen

An HE-gefärbten Gewebequerschnitten des an Tag 7 bzw. 35 entnommenen Myokards wurde die Fläche der Kardiomyozyten in 40-facher Vergrößerung mikroskopisch ausgemessen. Ausgewertet wurde der komplette Querschnitt des linken Ventrikels bzw. mindestens 100 Zellen/Tier (A). (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc). Abbildung B zeigt exemplarisch Ausschnitte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung der verschiedenen Tiergruppen.

4.3.2. Expressionsbestimmung der molekularen Marker für kardiale Druckveränderungen

Wie Abbildung 18A zeigt, war bei den Wildtyp-Mäusen, obwohl phänotypisch kein Unterschied zu den Knockout Mäusen bestand, nach TAC die relative mRNA-Menge von BNP um das 1,5-fache erhöht, während die ko-Mäuse keine merkwürdige Veränderung des mRNA-Gehalts aufwiesen (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,16$; C57BL/6J TAC = $1,60 \pm 0,20$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $0,76 \pm 0,32$; TRIF^{-/-} TAC = $0,52 \pm 0,18$; $p = \text{n.s.}$, Abbildung 18A). Fünf Wochen nach Ligatur war in beiden Tiergruppen die BNP-Genexpression mit relativen Werten von C57BL/6J TAC = $2,02 \pm 0,36$; $p = \text{n.s.}$ bzw. TRIF^{-/-} TAC = $2,51 \pm 0,44$; $p < 0,001$ vergleichbar.

ANP (Atriales Natriuretisches Peptid), ein Hormon, das von Kardiomyozyten bei Dehnungsreizen ausgeschüttet wird, zeigte ein vergleichbares Expressionsprofil (Abb. 18B). An Tag 7 war ANP insgesamt in den Wildtyp-Tieren doppelt so hoch wie in den TRIF defizienten Mäusen (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,35$; C57BL/6J TAC = $0,93 \pm 0,20$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $0,41 \pm 0,29$; TRIF^{-/-} TAC = $0,45 \pm 0,11$; $p = \text{n.s.}$). 35 Tage nach Ligatur war die Genantwort auf den Dehnungsreiz bei beiden Tiergruppen mit einer ca. dreifachen Expressionssteigerung nicht mehr unterschiedlich (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,17$; C57BL/6J TAC = $3,22 \pm 0,84$; $p < 0,05$; TRIF^{-/-} Sham = $0,72 \pm 0,27$; TRIF^{-/-} TAC = $3,32 \pm 0,58$; $p < 0,05$).

Ergebnisse

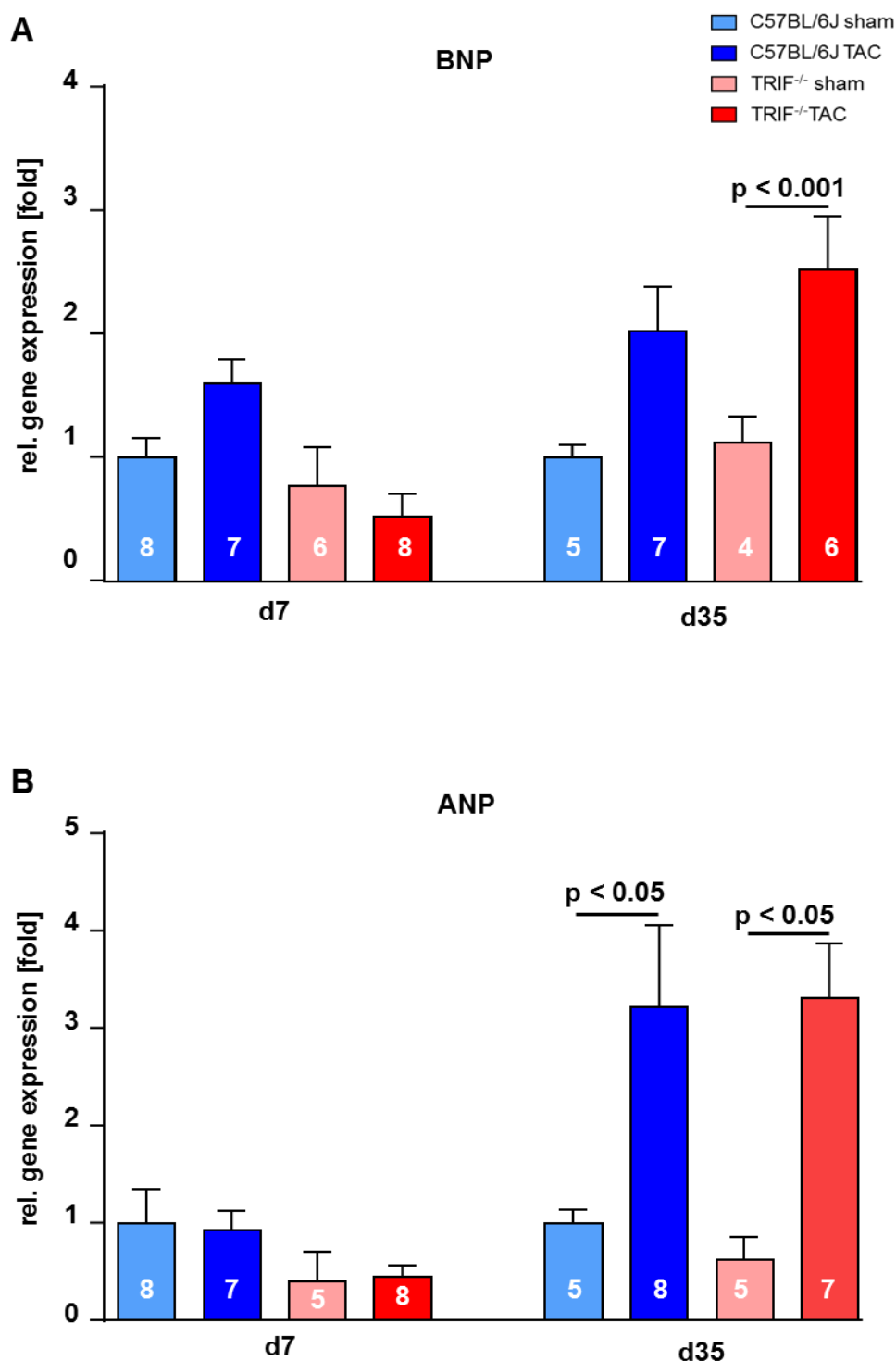


Abbildung 18: TRIF-Defizienz führt zu verzögertem Expressionsanstieg von vasodilatatorischen Botenstoffe nach Nachlasterhöhung

Die Bestimmung der Aktivierung fetaler Gene gibt Auskunft über maladaptive Prozesse. Aus isolierter mRNA des Myokards wurde die Reaktivierung von BNP an Tag 7 bzw. 35 durch Real Time-PCR bestimmt (A). Ebenso erfolgte aus dem gleichen Material die Messung der ANP-mRNA. (B). (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

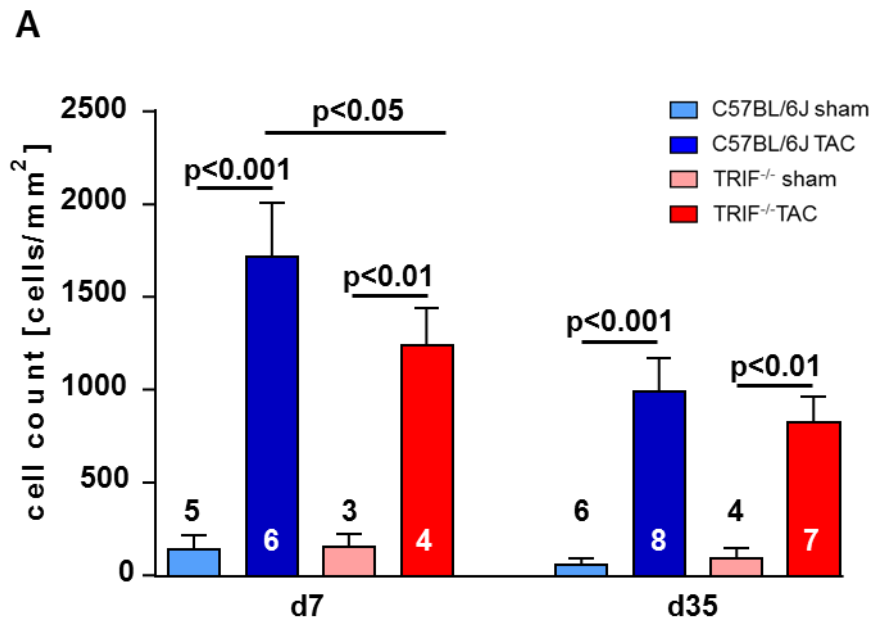
4.4. Inflammatorische Zellinfiltration

Da sich C57BL/6J- und TRIF^{-/-}-Mäuse in der Hypertrophie der Kardiomyozyten ähnelten, war die Frage, ob sich die Mäuse im Grad ihrer inflammatorischen Antwort unterscheiden. Dabei interessierte uns die Einwanderung inflammatorischer Zellen ins Myokard. Diese Zellen sind u.a. dafür bekannt, dass sie über Zytokinsekzernierung einen großen Einfluss auf regulatorische Mechanismen haben.

4.4.1. Einwanderung von CD3⁺ T-Lymphozyten

In wieweit das Fehlen von TRIF die Einwanderung von T-Lymphozyten beeinflusst, wurde mit Hilfe der immunhistologischen Färbungen des Myokards mit anti-CD3-TRITC untersucht. Die Kardiomyozyten wurden mit anti-alpha-sarkomerischem Aktin-FITC gegengefärbt. Die Auszählung der CD3-positiven Signale in der 100er Vergrößerung erbrachte an Tag 7 nach Nachlasterhöhung in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg inflammatorischer T-Lymphozyten (Abbildung 19A), wobei sich bei den Wildtyp-Tieren eine deutlich größere Einwanderungsrate verzeichnen ließ als bei den TRIF^{-/-}-Tieren. In den beiden Sham-Gruppen kam es zu keinem erheblichen Anstieg der T-Lymphozyten (C57Bl/6J Sham = $143,2 \pm 70,3$ Zellen/mm²; C57Bl/6J TAC = $1718,0 \pm 287,9$ Zellen/mm²; $p < 0,001$; TRIF^{-/-} Sham = $151,9 \pm 74,4$ Zellen/mm²; TRIF^{-/-} TAC = $1237,0 \pm 202,9$ Zellen/mm²; $p < 0,01$, p TAC vs. TAC $< 0,05$).

Diese Daten untermauern, dass die Einwanderung der T-Lymphozyten aus der Erhöhung der Nachlast und nicht aus einer Immunantwort aufgrund der OP-Verletzungen resultierte. Wie Abbildung 19A . zeigt, waren im Herzgewebe der 5 Wochen-Tieren wieder deutlich weniger T-Lymphozyten in den TAC-Tieren zu finden. Auch war hier kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen mehr zu verzeichnen (C57Bl/6J Sham = $52,3 \pm 35,73$ Zellen/mm²; C57Bl/6J TAC = $992,5 \pm 175,9$; $p < 0,001$; TRIF^{-/-} Sham = $93,04 \pm 55,2$ Zellen/mm²; TRIF^{-/-} TAC = $821,0 \pm 143,6$ Zellen/mm²; $p < 0,01$). Insgesamt wiesen die TAC-Tiere jedoch immer noch eine signifikant höhere Lymphozytenzahl im Herzgewebe als die Sham-Tiere auf.



B

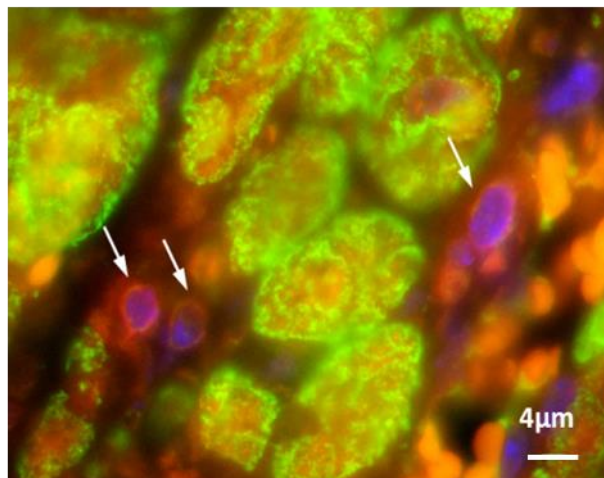
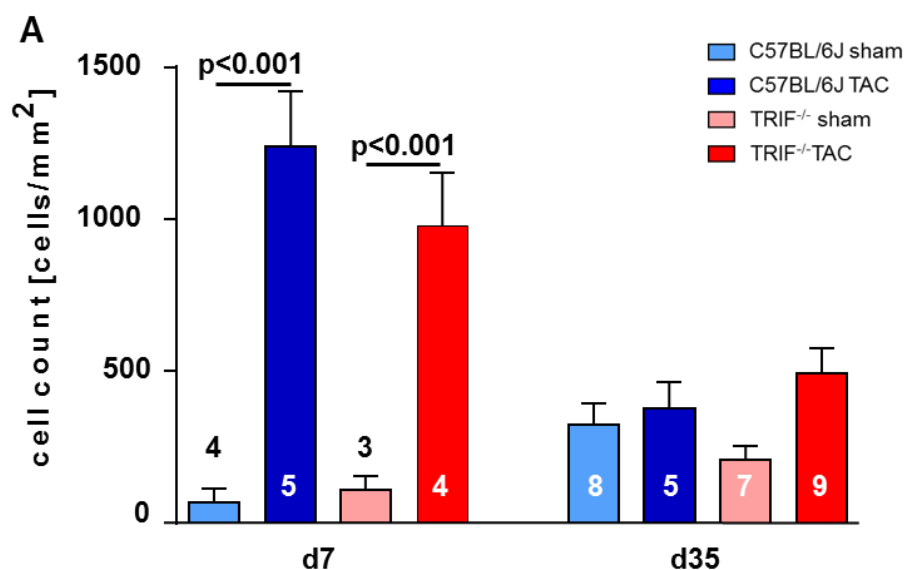


Abbildung 19: Immunhistologischer Nachweis von CD3⁺- Zellen im Myokard

Die Einwanderung von T-Lymphozyten ins Myokard wurde mit Hilfe der immunhistochemischen Färbemethode bestimmt. Zur Detektion der T-Lymphozyten wurden Paraffinschnitte des quergeschnittenen Myokards mit einem Anti-CD3-Antikörper und einem TRITC-markierten Sekundärantikörper inkubiert. In 15 Gesichtsfeldern/Tier wurden die CD3-positiven Zellen in der 100er Vergrößerung ausgezählt (A). (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc). Abb. B zeigt eine exemplarische Färbung von CD3⁺ T-Lymphozyten (rot, TRITC; weiße Pfeile) und Gegenfärbung der Kardiomyozyten mit anti-alpha-sarkomerischem Aktin (grün, FITC) in der 100er Vergrößerung.

4.4.2. Einwanderung von F4/80⁺ Makrophagen

Als zweiter inflammatorischer Zelltyp wurden Makrophagen über einem anti-F4/80-Antikörper detektiert. Auch dieser Antikörper wurde TRITC-markiert und die Kardiomyozyten mit anti-alpha-sarkomerischem Aktin-FITC gegengefärbt (Abbildung 20B). Wie auch bei den T-Lymphozyten zeigt sich an Tag 7 in beiden Tiergruppen eine hohe Einwanderungsrate von Makrophagen, wobei in der Kontrollgruppe nach TAC die Anzahl an F4/80-positiven Makrophagen höher war als in den TRIF^{-/-}-Tieren (C57Bl/6J Sham = 65,1 ± 47,9 Zellen/mm²; C57Bl/6J TAC = 1237,0 ± 181,5 Zellen/mm²; p < 0,001; TRIF^{-/-} Sham = 108,5 ± 45,1 Zellen/mm²; TRIF^{-/-} TAC = 976,3 ± 172,8 Zellen/mm²; p < 0,01) (Abbildung 20A). Fünf Wochen nach Nachlasterhöhung war die Zahl der Makrophagen im Myokard wieder auf dem Niveau der Sham-operierten Tiere (C57Bl/6J Sham = 320,6 ± 69,7 Zellen/mm²; C57Bl/6J TAC = 376,1 ± 86,5 Zellen/mm²; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = 207,8 ± 43,2 Zellen/mm²; TRIF^{-/-} TAC = 491,2 ± 82,2 Zellen/mm²; p = n.s.).



B

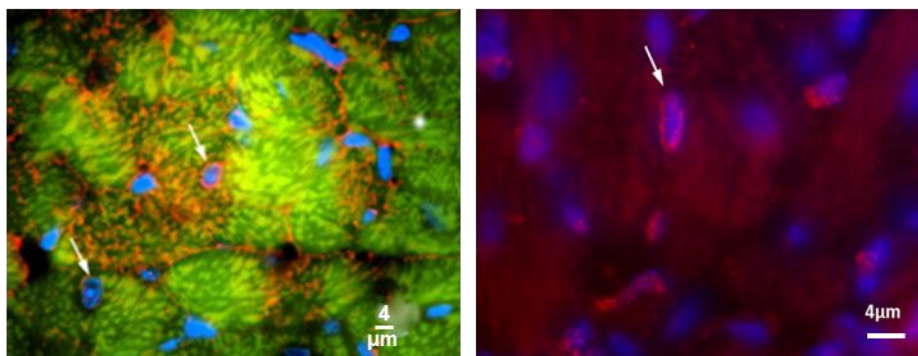


Abbildung 20: Immunhistologischer Nachweis von F4/80⁺- Zellen im Myokard

Die Einwanderung von Makrophagen ins Myokard wurde mit Hilfe der immunhistochemischen Färbemethode bestimmt. Die Detektion der F4/80-positiver Makrophagen wurde an Paraffinschnitte des Myokards mit einem Anti-F4/80-Antikörper und einem TRITC-markierten Sekundärantikörper durchgeführt. In 15 Gesichtsfeldern/Tier wurden die F4/80-positiven Zellen in der 100er Vergrößerung ausgezählt (A). (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc). Abb. B zeigt links eine exemplarische Färbung von F4/80-positiven Makrophagen (rot, TRITC; weiße Pfeile) und Gegenfärbung der Kardiomyozyten mit anti-alpha-sarkomerischem Aktin (grün, FITC) in der 40er und rechts eine exemplarische Färbung von F4/80-positiven Makrophagen in der 100er Vergrößerung (rot, TRITC; weiße Pfeile, ohne Gegenfärbung).

4.5. Expressionsanalyse von MyD88 – und TRIF-abhängiger Zytokine in linksventrikulärem Gewebe und in LPS-stimulierten Monozyten aus der Milz

Wie die Vorversuche an C57BL/6-Mäusen zeigten (siehe Abbildung 14), kommt es bereits 3 Tage nach Aortenligatur zu einem Anstieg von Myd88-abhängigen und -unabhängigen Zytokinen. Dabei stellte sich die Frage, ob die Zytokinexpression vorrangig lokal aus Zellen des Myokards oder aus Zellen des peripheren Blutes stammt, die aufgrund des inflammatorischen Impulses einwandern. Die Bestimmung der Zytokinexpression aus linksventrikulärem Gewebe und aus LPS-stimulierten Monozyten aus der Milz sollte darüber Aufschluss geben.

4.5.1. Zytokinexpression 7 Tage nach Aortenligatur

4.5.1.1. Zytokinexpression im Myokard

Die Untersuchung isolierter mRNA aus Gewebe des Myokards brachte zum Vorschein, dass die MyD88-abhängige Zytokinexpression myokardstämmiger Zellen in den beiden Tiergruppen unterschiedlich war. So stiegen die relative Genexpression von IL6- und CCL2-mRNA in den TAC-operierten TRIF-Tieren deutlich weniger an als in den Wildtyp-Mäusen (IL6: C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,24$, C57BL/6J TAC = $3,88 \pm 0,78$; $p < 0,001$; TRIF^{-/-} Sham = $0,75 \pm 0,15$, TRIF^{-/-} TAC = $1,23 \pm 0,28$; $p < 0,01$; CCL2: C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,10$, C57BL/6J TAC = $1,83 \pm 0,27$; $p = \text{n.s.}$ TRIF^{-/-} Sham = $0,91 \pm 0,17$, TRIF^{-/-} TAC = $1,24 \pm 0,40$; $p = \text{n.s.}$). Die TNF-alpha-mRNA wurde in den TRIF defizienten-Tieren nach Aortenligatur weniger exprimiert als in den Sham operierten Tieren (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,14$, C57BL/6J TAC = $1,21 \pm 0,13$; $p = \text{n.s.}$ TRIF^{-/-} Sham = $0,90 \pm 0,18$, TRIF^{-/-} TAC = $0,32 \pm 0,05$, Abbildung 21).

Im Myokard unterschied sich die Expression der TRIF-abhängigen Zytokine in den beiden Gruppen signifikant. Hier war zwischen den beiden Sham-Gruppen nur ein geringer Expressionsunterschied zu verzeichnen, dafür unterschieden sich die Werte nach Aortenligatur signifikant (Abbildung 22). Während die Nachlasterhöhung in den C57BL/6J-Mäusen zu einem Expressionsanstieg bei CXCL10, CXCL11 und CCL5 führte, bewirkte sie in den TRIF^{-/-}-Tieren keinen Anstieg (CXCL10: C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,17$, C57BL/6J TAC = $2,87 \pm 0,30$; TRIF^{-/-} Sham = $0,78 \pm 0,29$, TRIF^{-/-} TAC = $1,99 \pm 0,81$; CXCL11: C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,27$, C57BL/6J TAC = $1,28 \pm 0,25$;

Ergebnisse

TRIF^{-/-} Sham = 0,79 ± 0,15, TRIF^{-/-} TAC = 0,98 ± 0,06) bzw. gegenläufig einen Expressionsrückgang (CCL5: C57BL/6J Sham = 1,00 ± 0,23, C57BL/6J TAC = 1,52 ± 0,12; TRIF^{-/-} Sham = 0,81 ± 0,38, TRIF^{-/-} TAC = 0,51 ± 0,22; p < 0,05,; p TAC vs. TAC < 0,001).

4.5.1.2. Zytokinexpression in LPS-stimulierten Monozyten der Milz

Der Vergleich der relativen Zytokin-Expression LPS-stimulierter Monozyten aus der Milz ergab ein anderes Bild. So unterschied sich die relative Höhe der RNA-Expression nach Aortenligatur bei den MyD88-abhängigen Zytokinen kaum von der der Kontrollen (IL6: C57BL/6J Sham = 1,00 ± 0,13, C57BL/6J TAC = 0,97 ± 0,10; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = 0,78 ± 0,12, TRIF^{-/-} TAC = 0,91 ± 0,13; p = n.s.; TNF-alpha: C57BL/6J Sham = 1,00 ± 0,17, C57BL/6J TAC = 0,78 ± 0,09; TRIF^{-/-} Sham = 0,68 ± 0,08, TRIF^{-/-} TAC = 0,64 ± 0,04, p = n.s.) (Abbildung 21). Auffällig war allein CCL2, welches in beiden Tiergruppen nach Ligatur erniedrigt war (C57BL/6J Sham = 1,00 ± 0,23, C57BL/6J TAC = 0,40 ± 0,18; TRIF^{-/-} Sham = 0,76 ± 0,32, TRIF^{-/-} TAC = 0,25 ± 0,06; p = n.s.).

Bei den TRIF-abhängigen Zytokinen war der Effekt, der durch die Nachlasterhöhung hervorgerufen wurde, in den milzstämmigen Monozyten ebenfalls sehr gering. Im Gegensatz zu den MyD88-abhängigen Zytokinen unterschieden sich hier aber die beiden Tiergruppen bereits bei den Sham-operierten Kontrollen signifikant in der relativen Expression von CXCL10 (C57BL/6J Sham = 1,00 ± 0,14, C57BL/6J TAC = 0,83 ± 0,11; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = 0,27 ± 0,30, TRIF^{-/-} TAC = 0,23 ± 0,02; p = n.s.; p Sham vs. Sham < 0,001; p TAC vs. TAC < 0,001) und CCL5 (C57BL/6J Sham = 1,00 ± 0,09, C57BL/6J TAC = 0,85 ± 0,19; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = 0,32 ± 0,04, TRIF^{-/-} TAC = 0,36 ± 0,01; p = n.s.; p Sham vs. Sham = n.s.; p TAC vs. TAC < 0,001), wobei die TRIF^{-/-}-Tiere deutlich weniger mRNA aufwiesen als die C57BL/6J-Tiere (Abbildung 22). Bei der CXCL11-mRNA waren zwar die Grundwerte der Mäuse relativ identisch, aber die Aortenligatur erhöhte nur bei den C57BL/6J-Mäusen die mRNA-Menge, wohingegen sie sich bei den TRIF^{-/-}-Tieren sogar reduzierte (C57BL/6J Sham = 1,00 ± 0,17, C57BL/6J TAC = 1,33 ± 0,26; TRIF^{-/-} Sham = 0,92 ± 0,10, TRIF^{-/-} TAC = 0,60 ± 0,06; p = n.s., p = n.s.; p Sham vs. Sham < 0,001; p TAC vs. TAC < 0,01).

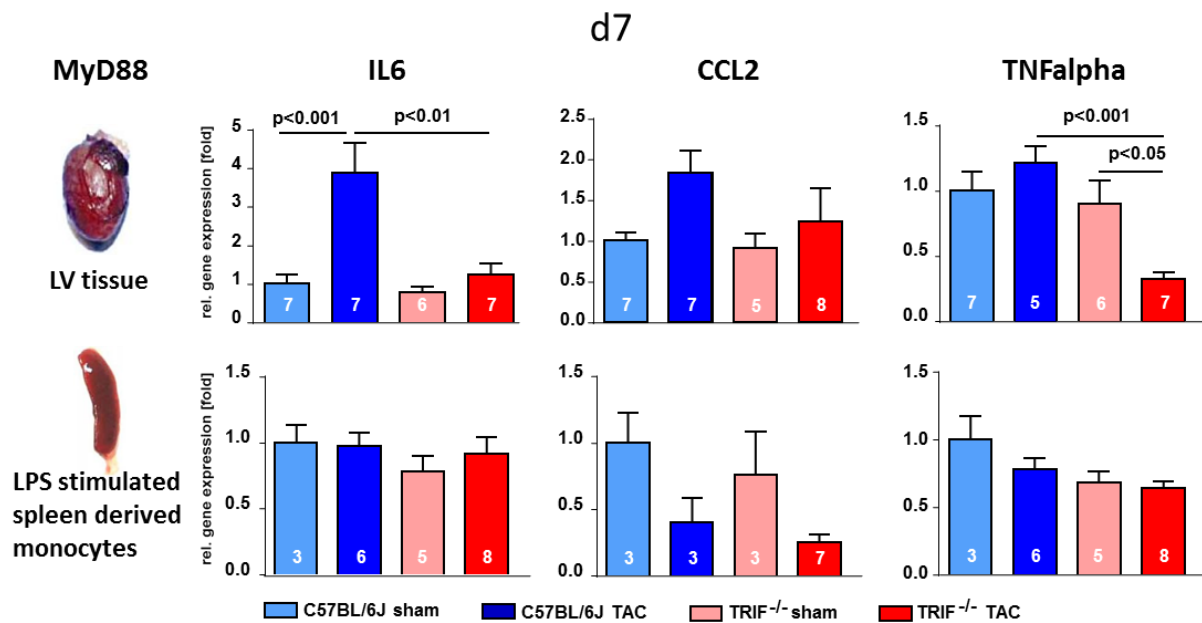


Abbildung 21: TRIF beeinflusst die Expression der MyD88-abhängiger Zytokine im Myokard an Tag 7 nach Transaortaler Konstriktion

Sieben Tage post TAC-OP erfolgte die Entnahme des Herzens und der Milz mit anschließender Isolation sowie LPS-Stimulation der peripheren Monozyten. Die mRNA der MyD88-abhängigen Zytokine wurde aus den beiden Ausgangsmaterialien mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Die Expression der Target-Gene wurde gegen 18s normalisiert. Es wurde relativ zur normalisierten Genexpression der C57BL6/J Sham-Tiere quantifiziert. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

Ergebnisse

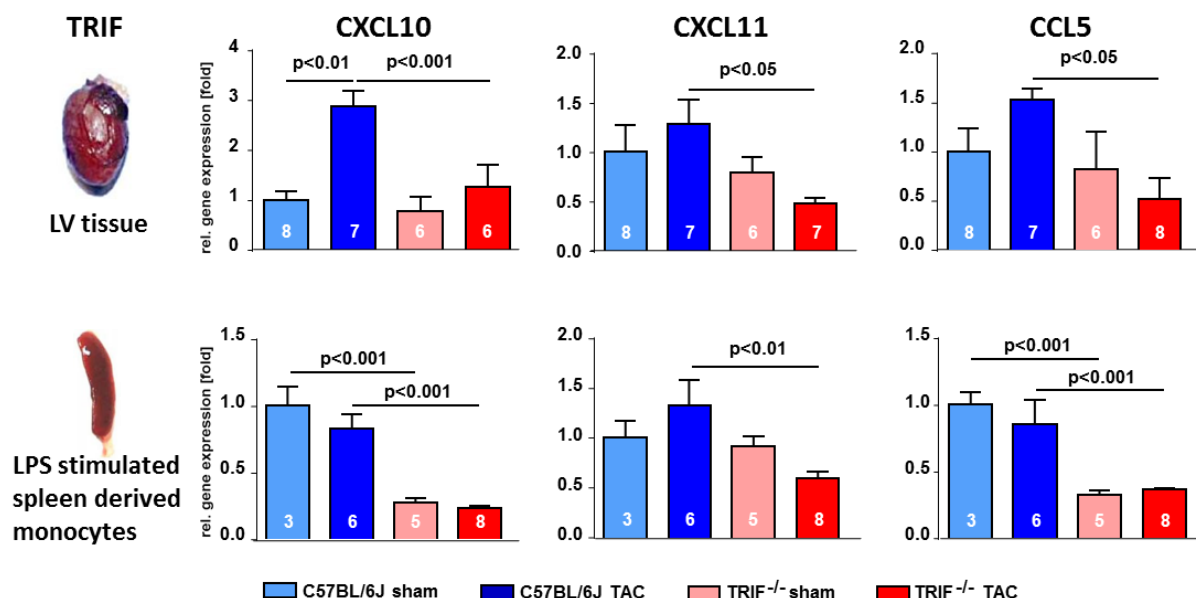


Abbildung 22: Die Erhöhung der Nachlast bewirkt einen Anstieg der Genexpression TRIF-abhängiger Zytokine bereits an Tag 7 nach Transaortaler Konstriktion

Sieben Tage post TAC-OP erfolgte die Entnahme des Herzens und der Milz mit anschließender Isolation sowie LPS-Stimulation der peripheren Monozyten. Die mRNA der TRIF-abhängigen Zytokine wurde aus den beiden Ausgangsmaterialien mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Die Expression der Target-Gene wurde gegen 18s normalisiert. Es wurde relativ zur normalisierten Genexpression der C57BL/6J Sham-Tiere quantifiziert. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

4.5.2. Zytokinexpression 35 Tage nach Aortenligatur

4.5.2.1. Zytokinexpression im Myokard

Die Genexpression der gleichen Zytokine wurde zum Zeitpunkt der manifestierten Hypertrophie (5 Wochen nach Ligatur) erneut bestimmt.

Nach 35 Tagen hatte sich im Myokard bei allen Targets die mRNA-Menge der TAC-Tiere den Werten der Sham-Kontrolltiere angenähert, und es lagen keine merkwürdigen Expressionsunterschiede mehr vor (Abbildung 23+Abbildung 24). Weder bei den MyD88-abhängigen Zytokinen wie IL6 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,33$, C57BL/6J TAC = $1,11 \pm 0,20$; TRIF^{-/-} Sham = $1,81 \pm 0,45$, TRIF^{-/-} TAC = $1,89 \pm 0,42$;) CCL2 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,27$, C57BL/6J TAC = $0,71 \pm 0,19$;

Ergebnisse

TRIF^{-/-} Sham = $1,38 \pm 0,21$, TRIF^{-/-} TAC = $0,83 \pm 0,20$;) und TNF-alpha (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,20$, C57BL/6J TAC = $0,71 \pm 0,17$; TRIF^{-/-} Sham = $1,26 \pm 0,23$, TRIF^{-/-} TAC = $0,87 \pm 0,14$) noch bei den TRIF-abhängigen Zytokinen wie CXCL10 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,19$, C57BL/6J TAC = $0,80 \pm 0,05$; TRIF^{-/-} Sham = $1,11 \pm 0,30$, TRIF^{-/-} TAC = $1,19 \pm 0,26$;) , CXCL11 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,29$, C57BL/6J TAC = $0,58 \pm 0,06$; TRIF^{-/-} Sham = $0,51 \pm 0,07$, TRIF^{-/-} TAC = $0,84 \pm 0,22$;) und CCL5 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,21$, C57BL/6J TAC = $0,80 \pm 0,17$; TRIF^{-/-} Sham = $0,65 \pm 0,23$, TRIF^{-/-} TAC = $0,80 \pm 0,19$) waren nach diesem Zeitraum post OP noch unterschiedlich Expressionshöhen zu sehen.

4.5.2.2. Zytokinexpression in LPS-stimulierten Monozyten der Milz

Zu diesem späten Zeitpunkt nach OP war in den LPS stimulierten Monozyten aus der Milz die relative Genexpression der MyD88-abhängigen Zytokine wie IL6 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,09$, C57BL/6J TAC = $1,03 \pm 0,10$; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = $0,96 \pm 0,06$, TRIF^{-/-} TAC = $0,93 \pm 0,04$; p = n.s.) und TNF-alpha (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,10$, C57BL/6J TAC = $1,09 \pm 0,08$; TRIF^{-/-} Sham = $1,02 \pm 0,11$, TRIF^{-/-} TAC = $0,94 \pm 0,06$; p = n.s.) war bei allen vier Tiergruppen nahezu identisch. Bei CCL2 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,29$, C57BL/6J TAC = $0,67 \pm 0,17$; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = $0,43 \pm 0,09$, TRIF^{-/-} TAC = $0,37 \pm 0,05$; p = n.s.) war die Genexpression in den TRIF^{-/-}-Tiere insgesamt etwas niedriger als in den C57BL/6J-Mäusen (Abbildung 23). Bei den TRIF-abhängigen Zytokinen war 35 Tage post OP weder ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Mausstämmen noch zwischen Sham- und TAC-Tieren vorhanden. Die relative Genexpression von CXCL10: (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,05$, C57BL/6J TAC = $1,30 \pm 0,31$; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = $1,39 \pm 0,44$, TRIF^{-/-} TAC = $1,17 \pm 0,31$; p = n.s.), CXCL11 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,09$, C57BL/6J TAC = $0,97 \pm 0,08$; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = $0,99 \pm 0,01$, TRIF^{-/-} TAC = $1,05 \pm 0,19$; p = n.s.) und CCL5 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,06$, C57BL/6J TAC = $1,11 \pm 0,22$; p = n.s. TRIF^{-/-} Sham = $1,02 \pm 0,05$, TRIF^{-/-} TAC = $1,09 \pm 0,08$; p = n.s.) entsprach bei allen Tieren nahezu der der Kontrollgruppe (Abbildung 24).

Diese Ergebnisse bestätigen sehr deutlich, dass sowohl MyD88-abhängige als auch MyD88-unabhängige (TRIF-abhängige) Zytokine beim myokardialen Remodeling

Ergebnisse

aufgrund von Nachlasterhöhung hauptsächlich in der frühen Phase aktiviert werden und im späteren Verlauf des Remodelings eine untergeordnete Rolle spielen.

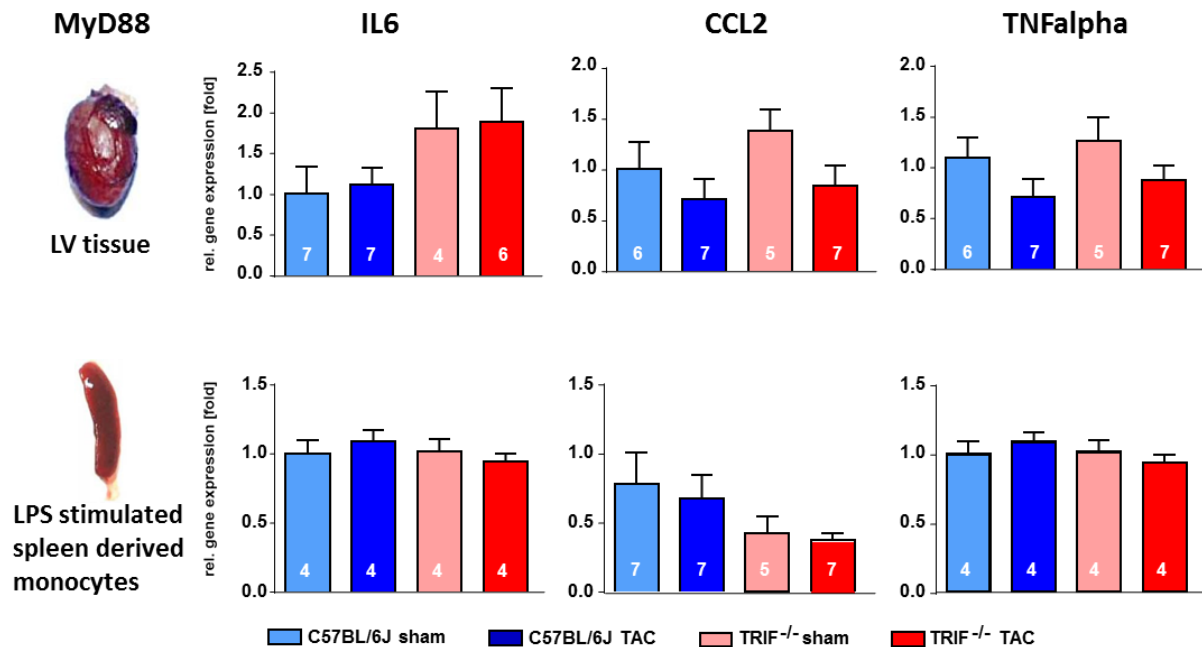


Abbildung 23: Angleichung der Genexpression der MyD88-abhängigen Zytokine an Tag 35 nach Transaortaler Konstriktion

35 Tage post TAC-OP erfolgte die Entnahme des Herzens und der Milz mit anschließender Isolation sowie LPS-Stimulation der peripheren Monozyten. Die mRNA der MyD88-abhängigen Zytokine wurde aus den beiden Ausgangsmaterialien mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Die Expression der Target-Gene wurde gegen 18s normalisiert. Es wurde relativ zur normalisierten Genexpression der C57BL/6J Sham-Tiere quantifiziert. (Darstellung: Mittelwert ± SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

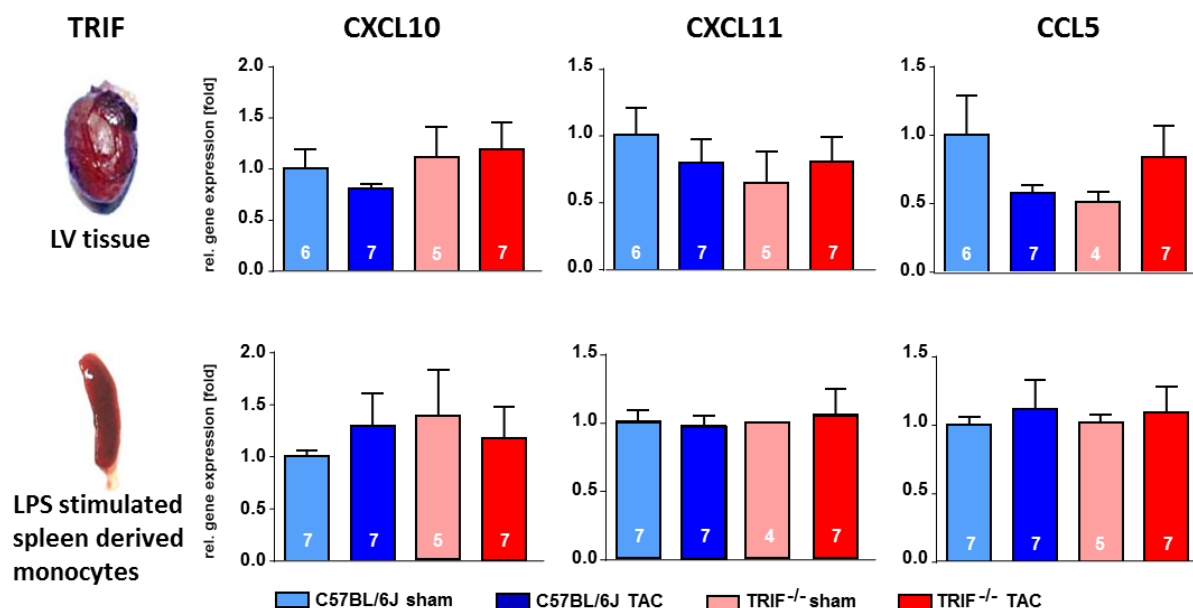


Abbildung 24: Angleichung der Genexpression der TRIF-abhängigen Zytokine an Tag 35 nach Transaortaler Konstriktion

35 Tage post TAC-OP erfolgte die Entnahme des Herzens und der Milz mit anschließender Isolation sowie LPS-Stimulation der peripheren Monozyten. Die mRNA der TRIF-abhängigen Zytokine wurde aus den beiden Ausgangsmaterialien mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Die Expression der Target-Gene wurde gegen 18s normalisiert. Es wurde relativ zur normalisierten Genexpression der C57BL/6J Sham-Tiere quantifiziert. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

4.6. Einfluss von TRIF auf die Entwicklung kardialer Fibrose

Fibrose, sowohl als interstitielle als auch perivaskuläre Kollegeneinlagerungen, sind neben der Hypertrophie, ein weiterer wichtiger Prozess beim maladaptiven Remodeling. Um den Einfluss des TRIF-Signalwegs auf die Auslösung einer profibrotischen Antwort zu klären, wurde zunächst der Kollegengehalt des linksventrikulären Gewebes bestimmt.

Wie Abbildung 25B zeigt, war bereits am siebten Tagen der Nachlasterhöhung vermehrte interstitielle Fibrose bei den TAC-Tieren beider Tiergruppen sichtbar. Die Auswertung der Picro-Siriusred-Färbung (Abbildung 25A) ergab für die Wildtyptiere einen linksventrikulären Kollagengehalt von $2,3 \pm 0,3\%$ (C57BL/6J Sham = $0,41 \pm 0,05\%$, C57BL/6J TAC = $2,33 \pm 0,26\%$; $p < 0,05$). Die TRIF^{-/-}-Tiere besaßen

Ergebnisse

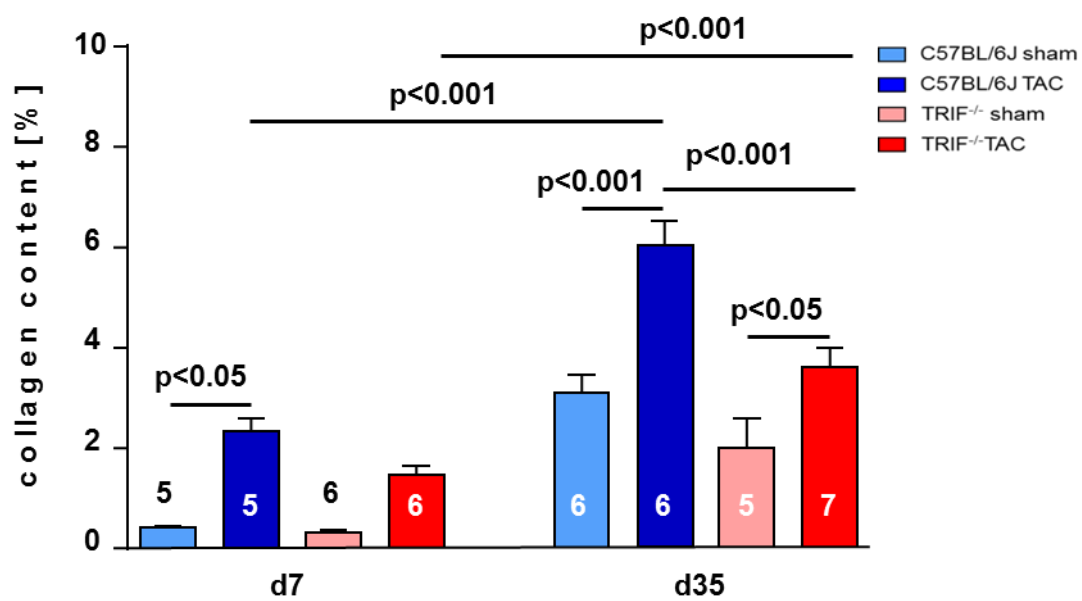
hingegen einen geringeren Kollagenanteil von $1,5 \pm 0,2\%$ ($\text{TRIF}^{-/-}$ Sham = $0,32 \pm 0,04\%$, $\text{TRIF}^{-/-}$ TAC = $1,46 \pm 0,20\%$; $p = \text{n.s.}$). Nach fünf Wochen hatte sich in beiden Tiergruppen der fibrotische Phänotyp manifestiert. Dabei wurde der Unterschied zwischen den ligierten $\text{TRIF}^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen deutlich. Die C57BL/6J-Tiere wiesen mit $6,0 \pm 0,5\%$ einen signifikant höheren Kollagenanteil auf als die $\text{TRIF}^{-/-}$ -Tiere mit $3,6 \pm 0,4\%$ (C57BL/6J Sham = $3,10 \pm 0,38\%$, C57BL/6J TAC = $6,02 \pm 0,52\%$; $p < 0,001$; $\text{TRIF}^{-/-}$ Sham = $1,99 \pm 0,61\%$, $\text{TRIF}^{-/-}$ TAC = $3,62 \pm 0,39\%$; $p < 0,05$).

Die Quantifizierung des Hydroxyprolin-Proteingehaltes des linksventrikulären Gewebes wurde als zweite Nachweismethode zur Bestimmung des Kollagengehaltes herangezogen. Die saure Hydrolyse von Kollagen ergibt nach der Neutralisation ein Proteinhydrolysat proteinogener α -Aminosäuren das kollagenspezifische Hydroxyprolin. Wie Abbildung 25C zeigt, war zum frühen Zeitpunkt des kardialen Remodelings der Hydroxyprolingehalt in den TAC-Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Sham-Tieren kaum erhöht (C57BL/6J Sham = $23,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$, C57BL/6J TAC = $24,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$; $p = \text{n.s.}$; $\text{TRIF}^{-/-}$ Sham = $31,8 \pm 4,0 \mu\text{M}$, $\text{TRIF}^{-/-}$ TAC = $38,8 \pm 3,4 \mu\text{M}$; $p = \text{n.s.}$), wobei die Knockout-Mäuse insgesamt aber einen etwas höheren Hydroxyprolingehalt aufwiesen. Fünf Wochen nach Transaortaler Konstriktion war der Hydroxyprolingehalt mit $93,4 \pm 16,9 \mu\text{M}$ in den TAC-Tieren der Wildtyp-Mäuse signifikant höher als in den $\text{TRIF}^{-/-}$ -Mäusen mit $54,8 \pm 6,1 \mu\text{M}$ (C57BL/6J Sham = $37,1 \pm 2,3 \mu\text{M}$, C57BL/6J TAC = $93,4 \pm 16,9 \mu\text{M}$; $p < 0,001$; $\text{TRIF}^{-/-}$ Sham = $50,3 \pm 4,7 \mu\text{M}$, $\text{TRIF}^{-/-}$ TAC = $54,8 \pm 6,1 \mu\text{M}$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ TAC vs. TAC} < 0,01$) (Abbildung 25A+B).

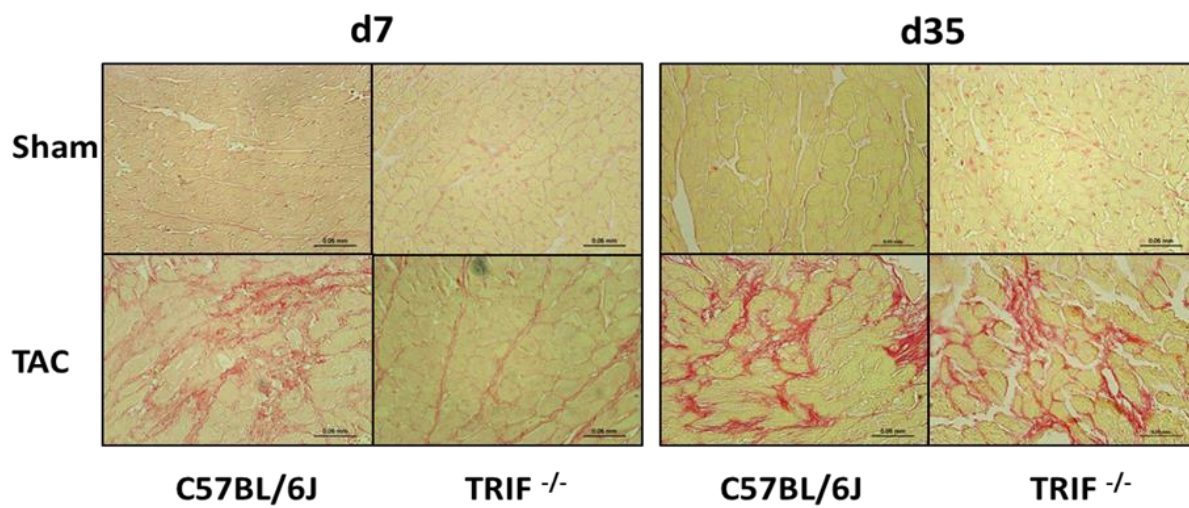
Auch molekularbiologisch zeigte sich bei der Expressionsbestimmung von Kollagen 1alpha (Abbildung 26) ein signifikanter Expressionsanstieg in den TAC-operierten Wildtypmäusen (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,25$, C57BL/6J TAC = $2,17 \pm 0,20$; $p < 0,05$). In den $\text{TRIF}^{-/-}$ -Mäusen war der Anstieg der relativen mRNA-Menge vergleichsweise geringer ($\text{TRIF}^{-/-}$ Sham = $1,10 \pm 0,29$, $\text{TRIF}^{-/-}$ TAC = $2,31 \pm 0,57$; $p = \text{n.s.}$). Nach 5 Wochen zeigten, die beiden Tierstämme eine vergleichbare relative mRNA-Expression (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,09$, C57BL/6J TAC = $1,54 \pm 0,30$; $p = \text{n.s.}$; $\text{TRIF}^{-/-}$ Sham = $0,73 \pm 0,12$, $\text{TRIF}^{-/-}$ TAC = $3,08 \pm 0,82$; $p = \text{n.s.}$).

Ergebnisse

A



B



C

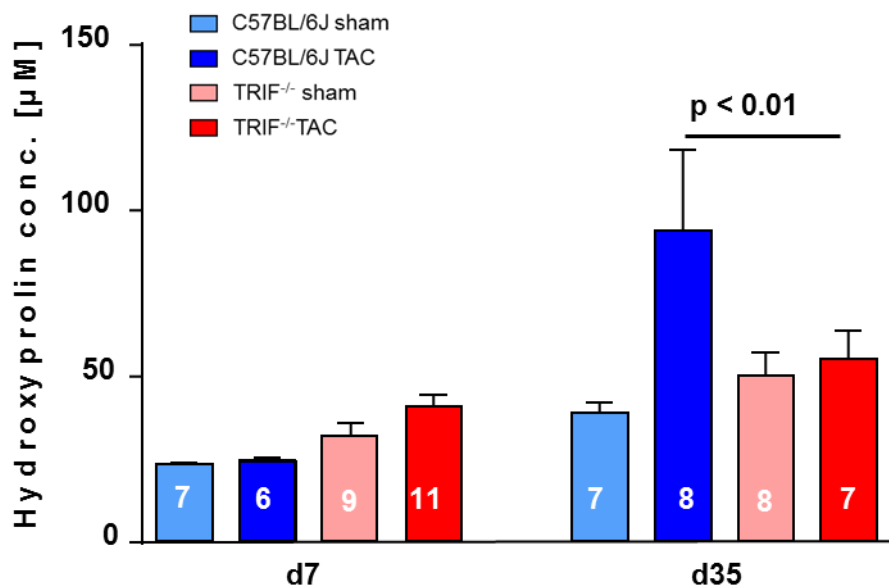


Abbildung 25: TRIF beeinflusst den Grad der interstitiellen Fibrose

7 bzw. 35 Tage nach Nachlasterhöhung wurde an Picosiriusred gefärbten mittventrikulären Gewebeschnitten der prozentuale Kollagengehalt in 10facher Vergrößerung über den Grad der Rotfärbung des gesamten Querschnitts bestimmt (A). Exemplarische Detailaufnahmen aus den 4 Tiergruppen zu den beiden Entnahmezeitpunkten finden sich in Abb. B. Aus je einem ca. 10mg schweren Gewebestück wurde zusätzlich photometrisch nach saurer Hydrolyse der Gehalt des kollagenspezifischen Hydroxyprolins bestimmt. Dargestellt ist der absolute Hydroxyprolingehalt des Gewebes in μM (C). (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

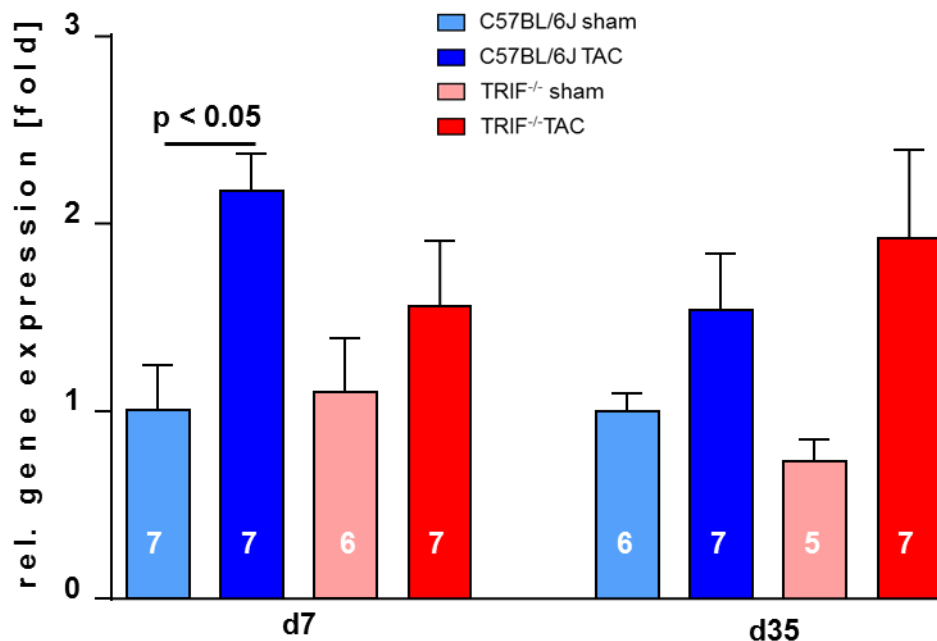


Abbildung 26: Gesteigerte Kollagen 1alpha Genexpression in Wildtyp-Tieren

Aus myokardialen Gewebe wurde die Kollagen 1alpha mRNA mittels quantitativer RT-PCR amplifiziert. Die Expression des Gens wurde gegen 18s normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression der C57BL/6J Sham-Tiere gesetzt. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

4.7. Bedeutung des TGF-beta Signalwegs für die Entstehung TRIF-abhängiger Fibrose

Die Vorversuche legten die Vermutung nahe, dass der TRIF-Signalweg die Fibrosierung beeinflusst. Die weiteren Untersuchungen sollen zur weiteren Entschlüsselung zu Grunde liegender Mechanismen dieser Annahme dienen. Neben dem pro-proliferativ wirkenden TNF alpha, dessen Genexpression in den Wildtyp-Tieren nach Nachlasterhöhung, wie bereits gezeigt (siehe 4.5), anstieg, ist TGF-beta ein wichtiger Marker für myokardiales Remodeling. Bekannt ist, dass nach Inflammation das Zytokin TGF-beta von vielen infiltrierenden Zellen wie Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten produziert wird. Die Freisetzung und Aktivierung von TGF-beta stimuliert Teile der extrazellulären Matrix, was eine wichtige Rolle bei der Gewebereparatur und der Kollagensynthese spielt.

4.8. TGF-beta Expression im Myokard

Aus Myokardgewebe der vier Mausgruppen wurde die TGF-beta Expression am frühen und späten Entnahmezeitpunkt bestimmt. An Tag 7 nach TAC (Abbildung 27A) war die mRNA in den Gruppen vergleichbar (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,14$, C57BL/6J TAC = $0,79 \pm 0,12$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $0,91 \pm 0,20$, TRIF^{-/-} TAC = $0,45 \pm 0,11$; $p = \text{n.s.}$). Die Proteinexpression im Myokard zeigte ein anderes Bild. So war TGF-beta in den TAC-operierten C57BL/6J-Mäusen um das Dreifache erhöht, wohingegen die Nachlasterhöhung in den TRIF^{-/-}-Tieren keinen Einfluss auf die Proteinexpression hatte (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,29$, C57BL/6J TAC = $3,17 \pm 0,85$; $p < 0,01$; TRIF^{-/-} Sham = $1,23 \pm 0,19$, TRIF^{-/-} TAC = $1,38 \pm 0,19$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ TAC vs. TAC} < 0,05$). Die mRNA-Expression blieb auch fünf Wochen nach Ligatur (Abbildung 27B) in den vier Tiergruppen auf Kontrollniveau (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,09$, C57BL/6J TAC = $0,75 \pm 0,08$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $0,48 \pm 0,12$, TRIF^{-/-} TAC = $0,91 \pm 0,82$; $p = \text{n.s.}$). In den TAC operierten C57BL/6J-Tieren war im Vergleich zu den Sham-Kontrollen die TGF-beta Proteinexpression immer noch ca. 3fach erhöht. Bei den TRIF ko-Mäusen blieb die TGF-beta Proteinexpression in den TAC-Tieren auf dem Niveau der Sham-Tiere (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,11$; C57BL/6J TAC = $3,10 \pm 1,07$; $p < 0,01$; TRIF^{-/-} Sham = $0,69 \pm 0,28$; TRIF^{-/-} TAC = $0,91 \pm 0,21$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ TAC vs. TAC} < 0,01$).

Ergebnisse

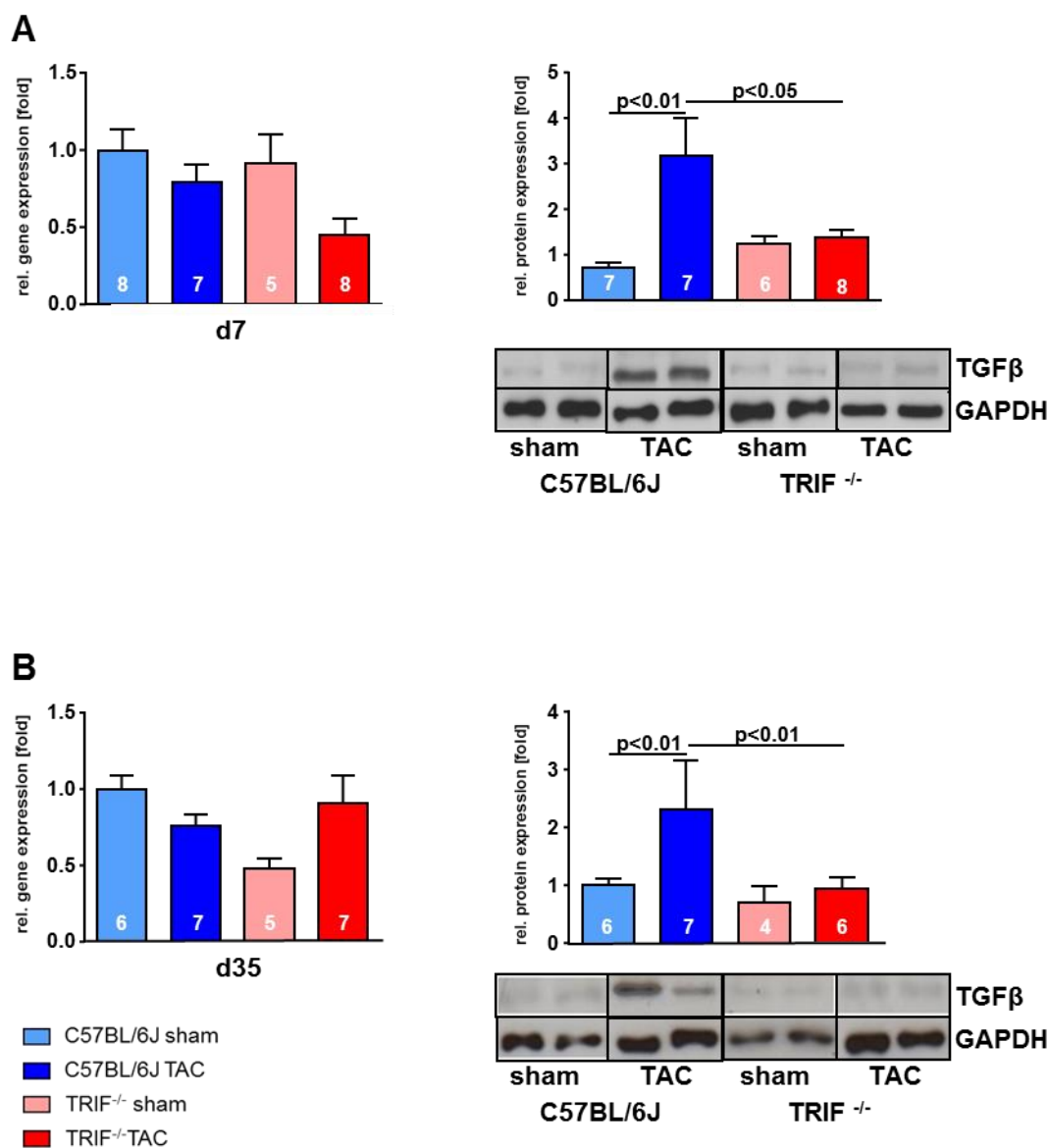


Abbildung 27: TRIF knockout führt zur verminderter TGF-beta Proteinexpression

Aus mRNA und Proteinisolaten des Myokards wurde zu beiden Untersuchungszeitpunkten, Tag 7 (A) und Tag 35 (B) die TGF-beta Expression mittels quantitativer RT-PCR bzw. Western Blot detektiert. Die Genexpression wurde gegen 18s normalisiert und die Proteinexpression gegen GAPDH. Es wurden pro Tier jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Unter den Balkendiagrammen sind repräsentative Westernblots dargestellt. Die normalisierten Werte wurden in Relation zu den C57BL6/J Sham-Tieren gesetzt (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

Ergebnisse

4.9. TGF-beta Expression in siRNA-transfizierten Zellen

Um herauszufinden, welcher Zelltyp hauptsächlich für die TRIF-induzierte TGF-beta Expression im Myokard verantwortlich ist, wurden im Westernblot die relative TGF-beta-Proteinexpression von siRNA-transfizierten THP1-Zellen, neonatalen Rattenfibroblasten und -kardiomyozyten bestimmt. Die Herunterregulation von TRIF in den 3 Zelltypen führte uniform zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression des profibrotischen TGF-beta (Abbildung 28). Tendenziell fiel die Reduktion der Proteinexpression in den Kardiomyozyten (neg-siRNA TX = $1,00 \pm 0,1$; TRIF-siRNA TX = $0,43 \pm 0,09$; $p < 0,05$) und den Fibroblasten (neg-siRNA TX = $1,00 \pm 0,22$; TRIF-siRNA TX = $0,49 \pm 0,08$; $p < 0,05$) etwas höher aus als in den stimulierten THP1-Zellen (neg-siRNA TX = $1 \pm 0,09$; TRIF-siRNA TX = $0,59 \pm 0,07$; $p < 0,05$). Somit kann kein allein verantwortlicher Zelltyp für das Entstehen des fibrotischen Phänotyps nach Nachlastserhöhung definiert werden. Vielmehr scheinen alle wichtigen Zelltypen des Myokards bei fibrotischen Umbauprozessen involviert zu sein und die Summe aller Zellantworten für das Ausmaß des Remodelings entscheidend zu sein.

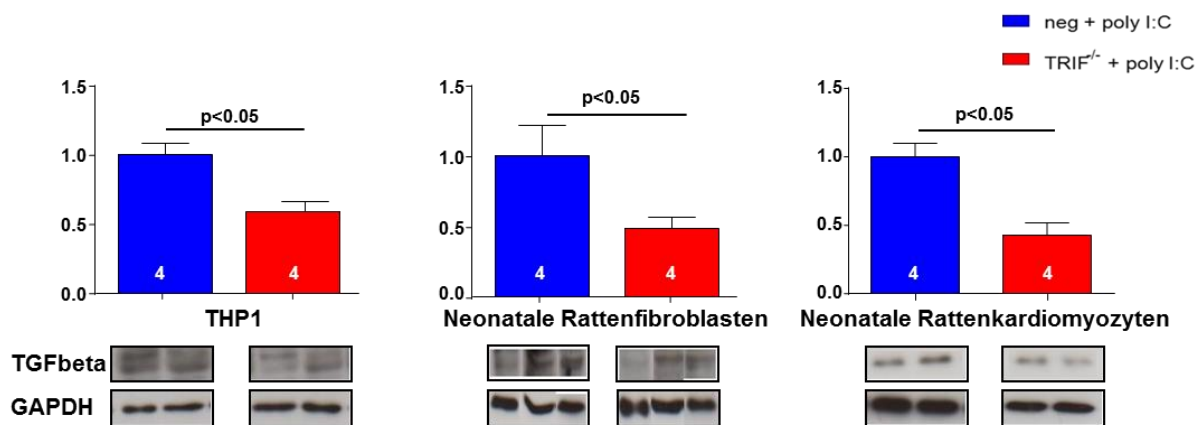


Abbildung 28: TRIF knock down führt in allen Zelltypen zu einer Reduktion der TGF-beta Proteinexpression

Neonatale Kardiomyozyten und Fibroblasten und mit PMA aktivierte THP1-Zellen wurden mit TRIF-siRNA bzw. einer Negativkontrolle für 48h transfiziert. Um eine Steigerung des Effekts zu erzielen, wurden die transfizierten Zellen vor dem Ernten für 16 h mit poly I:C stimuliert. Pro Zellisolat wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Unter den Balkendiagrammen sind repräsentative Westernblots der transfizierten Zellen abgebildet. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

4.10. Smad Signaling

In die TGF-beta Signalkaskade sind verschiedene Smad-Proteine involviert. So werden Rezeptor-assoziierte Smads (R-Smads, Smad 2, 3) durch TGF-beta aktiviert. Diese bilden einen Komplex mit Smad 4 (Co-Smad), der nach Translokation in den Kern direkt eine transkriptionelle Antwort auslöst.

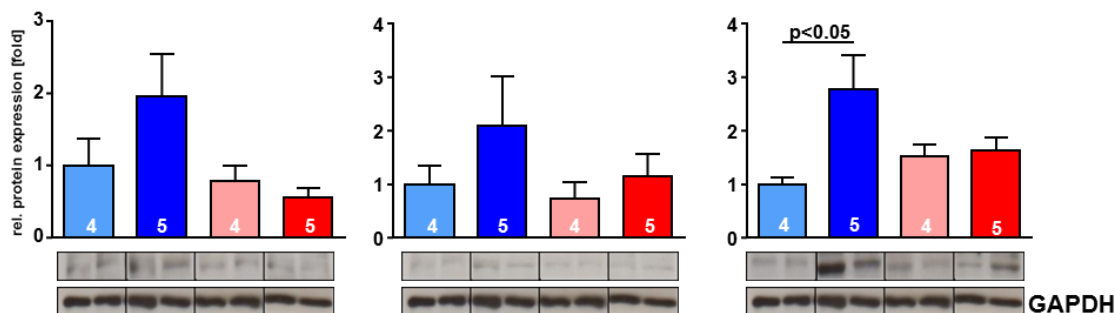
In den TRIF ko-Mäusen scheint die mit TGF-beta assoziierte maladaptive Signalkaskade nach Nachlasterhöhung zu dem frühen Zeitpunkt (Abbildung 29A) kaum aktiviert zu sein. So wiesen im Westernblot das Smad 3-Protein (TRIF^{-/-} Sham = $0,80 \pm 0,21$, TRIF^{-/-} TAC = $0,57 \pm 0,12$; p = n.s.) bzw. das phosphorylierte pSmad 3 (TRIF^{-/-} Sham = $0,74 \pm 0,29$, TRIF^{-/-} TAC = $1,14 \pm 0,42$; p = n.s.) in den TRIF ko-Mäusen nach TAC keine Veränderung der Expression auf. In den TAC-Wildtypmäusen hingegen war Smad 3 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,38$, C57BL/6J TAC = $1,96 \pm 0,59$; p = n.s.) wie auch pSmad 3 (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,35$, C57BL/6J TAC = $2,10 \pm 0,93$; p = n.s.) doppelt so hoch exprimiert wie in den Sham-Tieren. Das Co-Smad Smad 4 war ebenfalls nur in den Wildtyp-Mäusen nach TAC um das 2,5-Fache erhöht (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,14$; C57BL/6J TAC = $2,77 \pm 0,63$; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = $1,53 \pm 0,20$; TRIF^{-/-} TAC = $1,62 \pm 0,25$; p = n.s.).

Zum späten Entnahmezeitpunkt (Abbildung 29B) war Smad 3 in den Sham und TAC Tieren vergleichbar exprimiert (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,17$; C57BL/6J TAC = $0,65 \pm 0,12$; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = $1,88 \pm 0,64$; TRIF^{-/-} TAC = $1,34 \pm 0,35$; p = n.s.). Die aktive Form hingegen war in den TRIF^{-/-}-TAC-Tieren jetzt doppelt so hoch exprimiert wie in den Sham-Tieren (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,35$; C57BL/6J TAC = $2,10 \pm 0,93$; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = $0,74 \pm 0,29$; TRIF^{-/-} TAC = $1,14 \pm 0,42$; p = n.s.). Die Smad 4 Expression war 35 Tage nach Aortenligatur bei beiden Tiergruppen auf Kontrollniveau (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,16$; C57BL/6J TAC = $1,11 \pm 0,31$; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = $1,55 \pm 0,37$; TRIF^{-/-} TAC = $0,94 \pm 0,23$; p = n.s.).

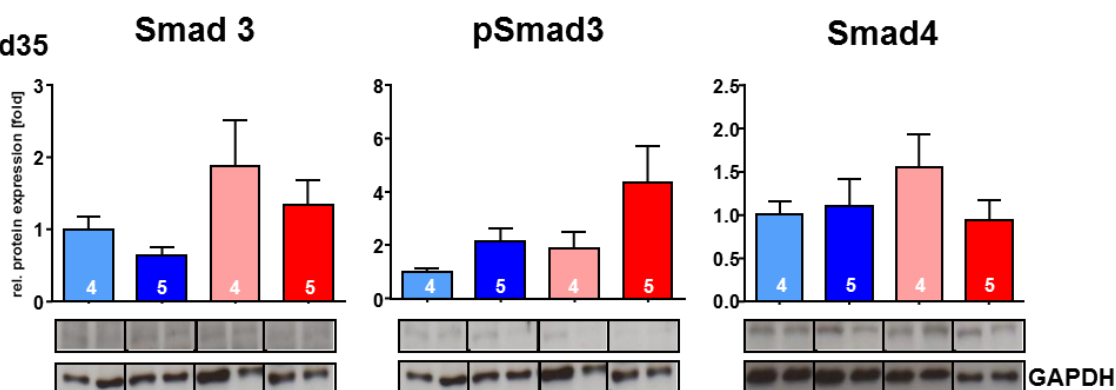
Der Smad-Komplex ließ sich auch im Zellkern nachweisen. Wir fanden in den TAC-operierten Wildtypen eine ca. dreifach höhere Konzentration von phosphoryliertem Smad 3 im Kernisolat des Herzwes. Bei den TRIF^{-/-}-Tieren war kein Anstieg der Proteinexpression zu verzeichnen (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,15$; C57BL/6J TAC = $3,28 \pm 1,60$; p = n.s.; TRIF^{-/-} Sham = $1,46 \pm 0,77$; TRIF^{-/-} TAC = $1,02 \pm 0,27$; p = n.s.) (Abbildung 29C).

Ergebnisse

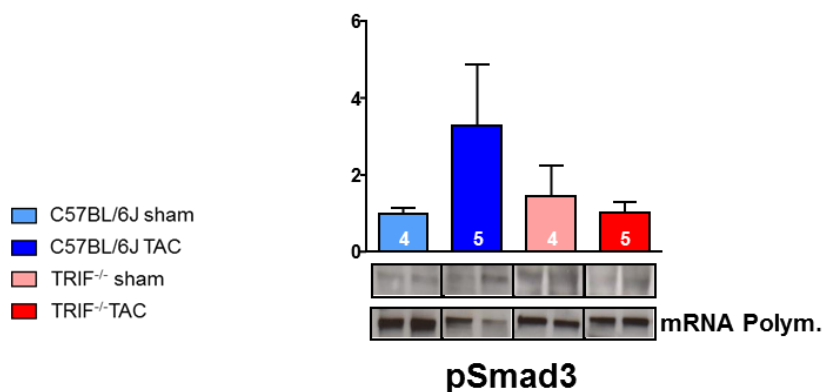
A d7



B d35



C

**Abbildung 29: TRIF beeinflusst die myokardiale Smad-Expression**

Aus den Proteinisolaten des Myokards wurden 7 Tage (A) und 35 Tage (B) nach Nachlasterhöhung die Proteinexpression von Smad 3, dessen aktivierter Form, pSmad 3 und Smad 4 bestimmt und gegen das Referenzprotein GAPDH normalisiert. In der nukleären Proteinfraction (C) wurde zur Normalisierung des pSmad 4-Expression die Expression der nukleären mRNA Polymerase 2 bestimmt. Die Werte wurden in Relation zur Expression in den Sham-Kontrollen gesetzt. Es wurden pro Tier jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Unter den jeweiligen Balkendiagrammen sind repräsentative Westernblots dargestellt. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

4.11. Fibrose-assoziierte miRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind an der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität beteiligt und sind somit entscheidende Regulatoren der kardiovaskulären Pathologie. Die Expression von miR29 (Abbildung 30A), das zu den Schlüsselregulatoren für die Modulation der kardialen Fibrose im Rahmen des TGF-beta Signalings gehört, fand sich in den Sham-Kontrollen der TRIF^{-/-}-Mäusen im Herzgewebe mit einer ca. 1,5-fach höheren Expression als in den Wildtyp-Tieren. Während bei diesen nach TAC die Expression der microRNA unverändert blieb, stieg sie in den ligierten TRIF^{-/-}-Mäusen auf $2,3 \pm 0,7$ – fach an (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,25$; C57BL/6J TAC = $0,98 \pm 0,08$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $1,54 \pm 0,40$; TRIF^{-/-} TAC = $2,34 \pm 0,71$; $p = \text{n.s.}$).

Ein nächstes Augenmerk legten wir auf die Expressionsbestimmung von miR146a (Abbildung 30B), deren mögliches Target Smad 4 ist. Hier war in den TRIF^{-/-}-Tieren der Grundlevel um das 5-Fache höher als in den Wildtyp-Mäusen. Die Erhöhung der Nachlast hatte hingegen keinen Einfluss in den TRIF ko-Mäusen, steigerte aber die Expression in den C57BL/6J-Tieren um das Dreifache (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,17$; C57BL/6J TAC = $2,95 \pm 1,29$; $p < 0,01$; TRIF^{-/-} Sham = $5,51 \pm 0,87$; TRIF^{-/-} TAC = $5,51 \pm 1,64$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ Sham vs. Sham} < 0,05$).

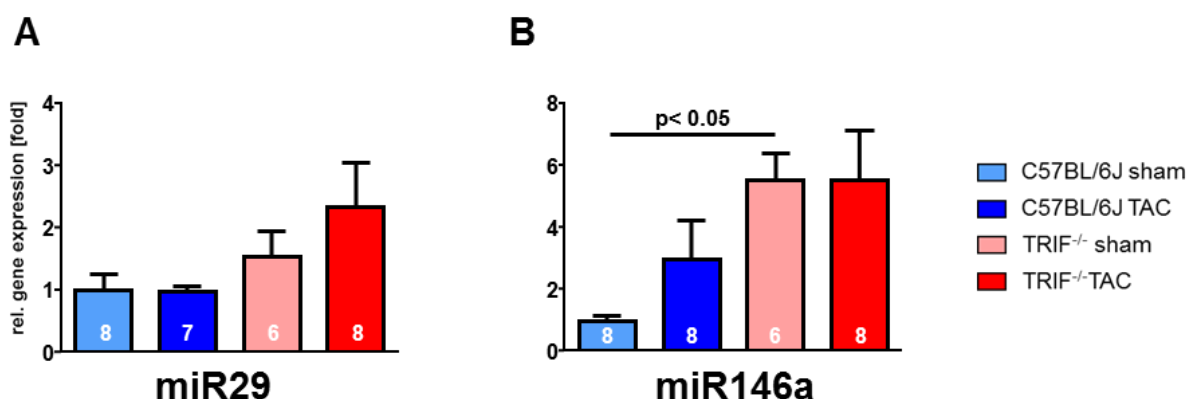


Abbildung 30: Antifibrotisch wirkende miRNAs werden nach TRIF-Defizienz vermehrt produziert

Die Bestimmung von miR29 und 146a erfolgte aus myokardialen Gewebeisolat, welches am Tag 7 post OP entnommen wurde. Quantifiziert wurde mit TaqMan-Sonden in Realtime-PCR. Die RNU6b-miRNA wurde als Referenzgen verwendet. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

Ergebnisse

4.12. Nicht Smad assoziierter Signalweg

Neben dem Smad-Signaling kann die Regulation von TGF-beta auch über den Akt-Signalweg erfolgen. Die Proteinkinase Akt ist involviert in die Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs. Wie Abbildung 31 zeigt, war die Gesamtexpression von Akt nur geringfügig moduliert und wies in allen beiden Tierstämmen ähnliche Werte auf (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,27$; C57BL/6J TAC = $1,29 \pm 0,21$; TRIF^{-/-} Sham = $1,00 \pm 0,38$; TRIF^{-/-} TAC = $1,36 \pm 0,25$; $p = \text{n.s.}$). Die Nachlasterhöhung bewirkte eine dreifachen Expressionszunahme der aktiven Isoform in den TRIF^{-/-}-Mäusen. Diese Auswirkung zeigte sich bei den Wildtypmäusen nicht (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,36$; C57BL/6J TAC = $1,25 \pm 0,14$; TRIF^{-/-} Sham = $1,00 \pm 0,27$; TRIF^{-/-} TAC = $2,78 \pm 0,48$; $p < 0,01$; P TAC vs. TAC $< 0,5$). Der Effekt wurde aber bei der Betrachtung des Verhältnisses von aktiviertem Protein und zu Gesamtprotein relativiert, und die beiden genetisch unterschiedlichen Mäuse wiesen eine ähnliche Ratio auf (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,07$; C57BL/6J TAC = $1,15 \pm 0,29$; TRIF^{-/-} Sham = $0,69 \pm 0,27$; TRIF^{-/-} TAC = $1,34 \pm 0,37$; $p = \text{n.s.}$) (Abbildung 31).

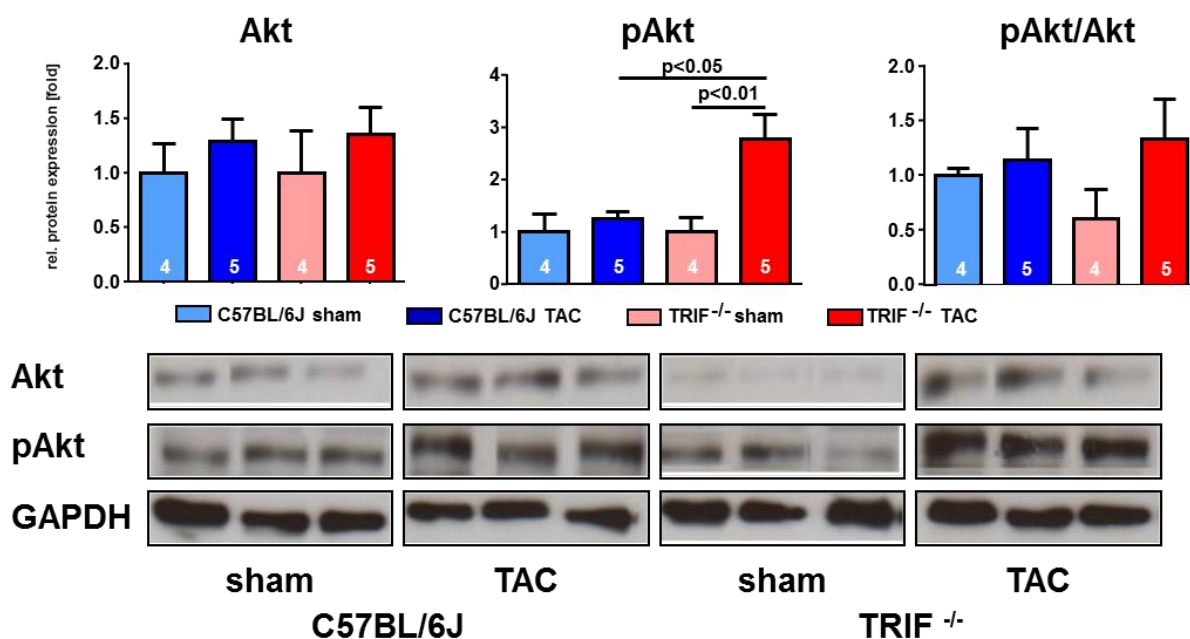


Abbildung 31: TRIF hat keinen nachvollziehbaren Einfluss auf die Aktivierung der Proteinkinase Akt

Aus dem Proteinlysate der 7-Tage-Tiere erfolgte die Westernblotanalyse von Akt und seiner aktiven Form pAkt. Normalisiert wurde gegen das Referenzgen GAPDH. Es wurden pro Tier jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Unter den jeweiligen Balkendiagrammen sind repräsentative Westernblots dargestellt. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

4.13. Aktivierung von Tumorsuppressorgenen

Dass im Myokard der TAC-operierten TRIF^{-/-}-Mäusen proliferatorische Prozesse gesteigert stattfinden, ließ bereits die erhöhte Aktivität von Akt (siehe 4.12) vermuten. Nun stellte sich die Frage, ob apoptotische Ereignisse unterschiedlich in den beiden Mausstämmen ausgeprägt sind. Dazu wurden die Expressionsmuster der Tumorsuppressorgene p53, p16 und die Bax/Bcl-2-Ratio, die auf zellulärer Ebene bei der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, determiniert. Der Nachweis Apoptose-assoziiierter Targets erfolgte auf Proteinebene.

In den Wildtypmäusen machte der Westernblot eine gesteigerte Expression von p53 nach Ligatur sichtbar (Abbildung 32A), wohingegen das Fehlen von TRIF dazu führt, dass p53 nicht aktiviert wurde (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,17$; C57BL/6J TAC = $1,87 \pm 0,35$; $p < 0,05$; TRIF^{-/-} Sham = $0,86 \pm 0,26$; TRIF^{-/-} TAC = $0,99 \pm 0,11$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ TAC vs. TAC} < 0,05$). Ein gleiches Expressionsmuster war für das durch p53 aktivierte p16-Protein zu finden (Abbildung 32B) (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,30$; C57BL/6J TAC = $2,33 \pm 0,40$; $p < 0,01$; TRIF^{-/-} Sham = $0,63 \pm 0,20$; TRIF^{-/-} TAC = $1,08 \pm 0,20$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ TAC vs. TAC} < 0,05$). Hier kam es in den Wildtypmäusen zu einer Verdoppelung der Proteinexpression, während der Expressionsanstieg in den TRIF ko-Mäusen zu vernachlässigen war. Ein weiterer Hinweis auf gesteigertes maladaptives Remodeling, hervorgerufen durch Apoptose in den C57BL/6J-Mäusen, war die Bax/Bcl-2-Ratio (Abbildung 32C). Das Verhältnis von Bax, einem Apoptose-Promotor, und Bcl-2, einem Apoptose-Inhibitor, war in den Wildtypmäusen im Grundlevel bereits um das Dreifache höher als in den TRIF^{-/-}-Mäusen. Nach Ligatur erfolgte ein Expressionsanstieg nur in den Wildtypmäusen (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,04$; C57BL/6J TAC = $1,44 \pm 0,13$; $p < 0,05$; TRIF^{-/-} Sham = $0,25 \pm 0,10$; TRIF^{-/-} TAC = $0,24 \pm 0,05$; $p = \text{n.s.}$; $p \text{ TAC vs. TAC} < 0,01$). Der Nachweis von p53 (neg-siRNA TX = $1,00 \pm 0,15$ TRIF-siRNA TX = $0,60 \pm 0,05$; $p = \text{n.s.}$), p16 (neg-siRNA TX = $1,00 \pm 0,36$; TRIF-siRNA TX = $0,50 \pm 0,10$; $p = \text{n.s.}$), sowie Bax und Bcl-2 (neg-siRNA TX = $1,00 \pm 0,27$; TRIF-siRNA TX = $0,57 \pm 0,17$; $p = \text{n.s.}$) in si-transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (Abbildung 33) zeigte ebenfalls, dass die Expression proapoptotischen Gene nach TRIF knockdown zurückgeht.

Die Expressionsunterschiede in den beiden Mausstämmen sowie in der Zellkultur legen nahe, dass die TRIF^{-/-}-Mäuse aufgrund verminderter Apoptose ein weniger ausgeprägtes maladaptives Remodeling aufweisen.

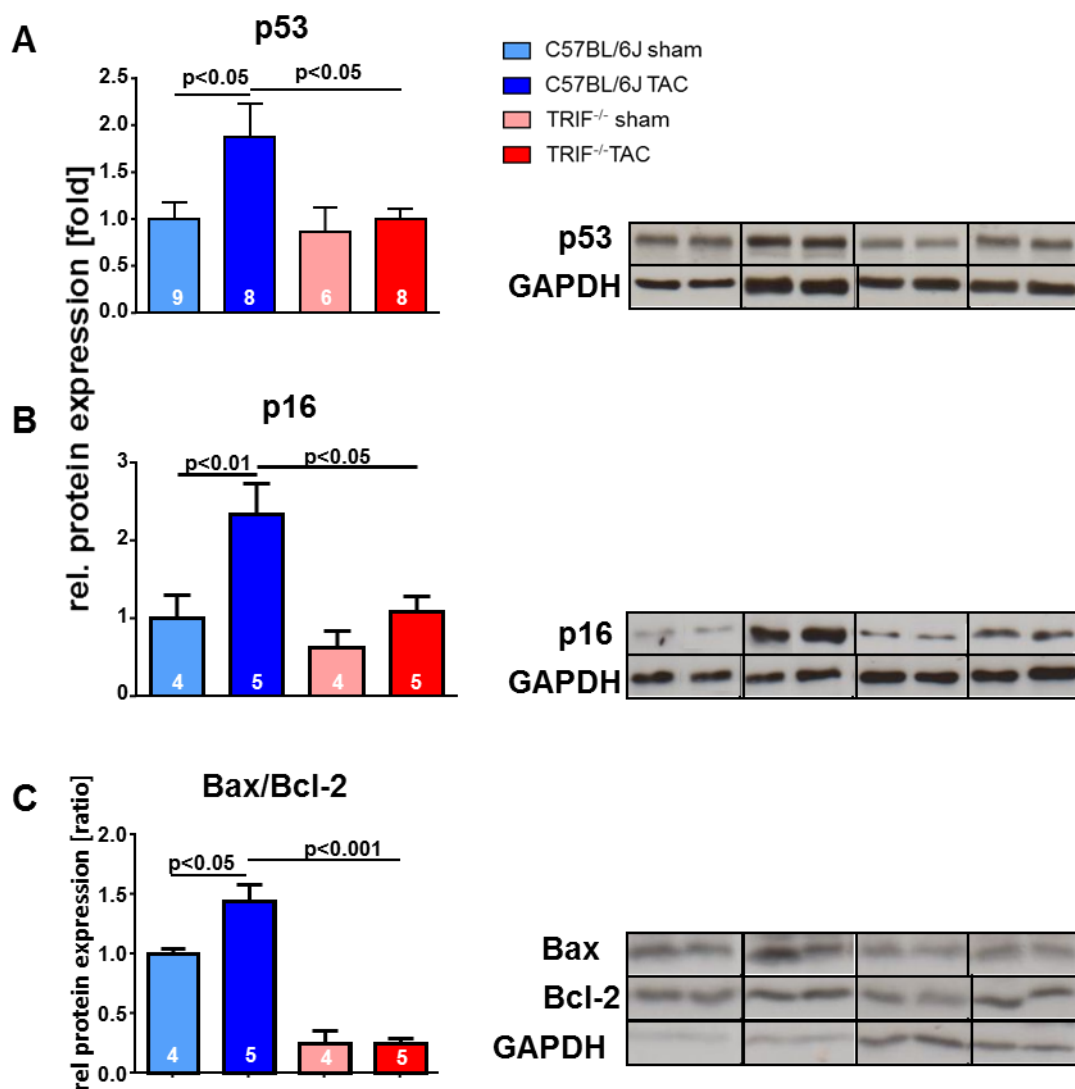


Abbildung 32: TRIF-Defizienz verhindert die Aktivierung proapoptotischer Gene

Aus isolierten Proteinen des Myokards der 7-Tage-Tiere wurden in Westernblot-Analysen die Expression der Tumorsuppressorgene p53 (A), p16 (B) sowie die Bax/Bcl-2-Ratio (C) detektiert. Die Werte wurden gegen GAPDH normalisiert. Die Expressionsrate wurde relativ auf die C57BL/6J-Sham-Gruppe bezogen. Es wurden pro Tier jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Abgebildet sind repräsentative Westernblots der vier Tiergruppen. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

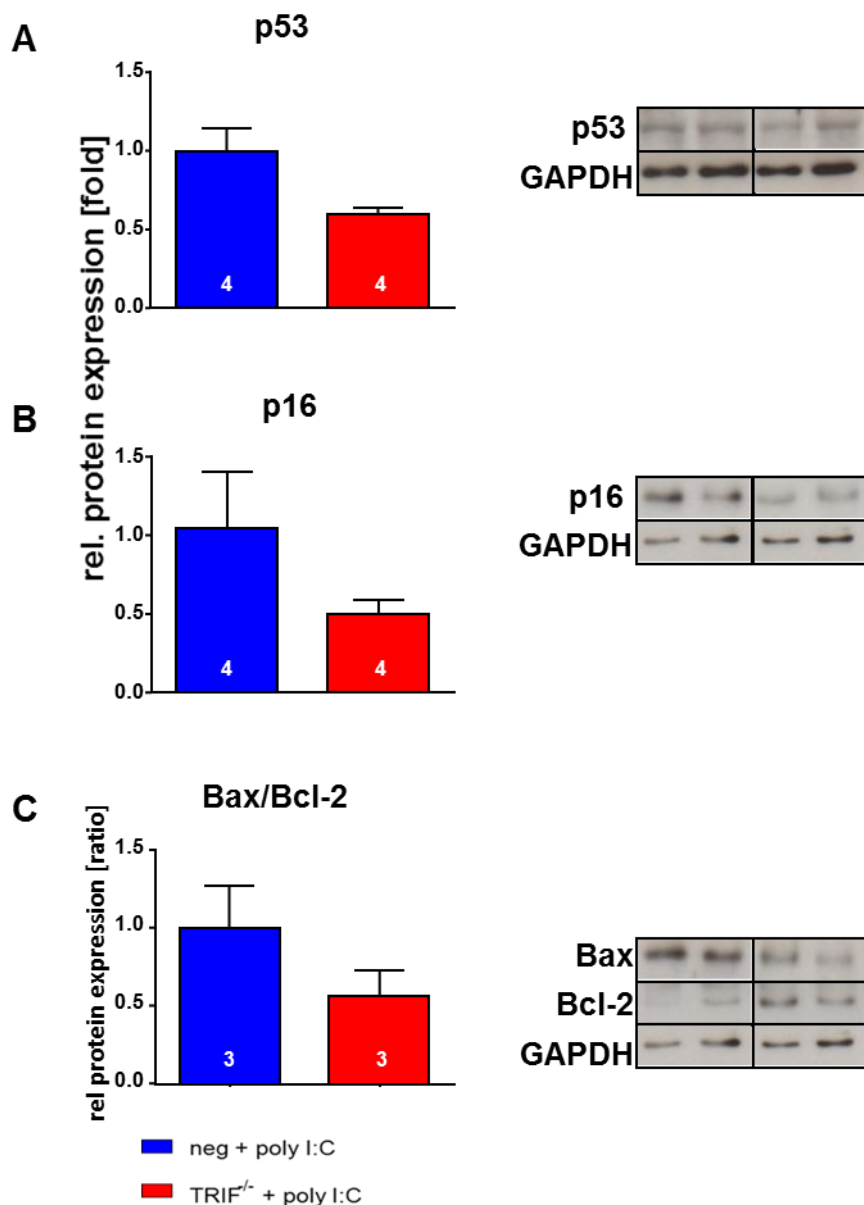


Abbildung 33: TRIF knock down führt zu geringerer Expression von proapoptotischen Genen

Aus isolierten Proteinen aus si-transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden in Westernblot-Analysen die Expression der Tumorsuppressorgene p53 (A), p16 (B) sowie die Bax/Bcl-2-Ratio (C) detektiert. Die Werte wurden gegen GAPDH normalisiert. Es wurden pro Tier jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Abgebildet sind repräsentative Westernblots (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit in den Balken angegebener n-Zahl; Statistik: ungepaarter T-Test).

Ergebnisse

4.14. Einfluss von TRIF auf proliferatorische Eigenschaften

In vitro Experimente mit TRIF-siRNA transfizierten neonatalen Kardiomyozyten und Fibroblasten sollten zeigen, ob sich die Proliferation der Zellen durch das Ausschalten von TRIF verändern.

Ein TRIF knockdown bewirkte in den neonatalen Kardiomyozyten eine Verdopplung der Proliferationsrate (neg-siRNA TX = $0,37 \pm 0,06$; TRIF-siRNA TX = $0,90 \pm 0,10$; $p < 0,01$) (Abbildung 34A), wohingegen bei Fibroblasten ein gegenteiliger Effekt zu sehen war (neg-siRNA TX = $0,36 \pm 0,01$; TRIF-siRNA TX = $0,30 \pm 0,01$; $p < 0,05$). Hier bewirkte das Fehlen von TRIF eine Verringerung der Teilungsrate (Abbildung 34A).

Somit hat das Niederregulieren von TRIF einen positiven Einfluss auf die kardiomyozytäre Proliferation und wirkt fibrozytärem Wachstum entgegen.

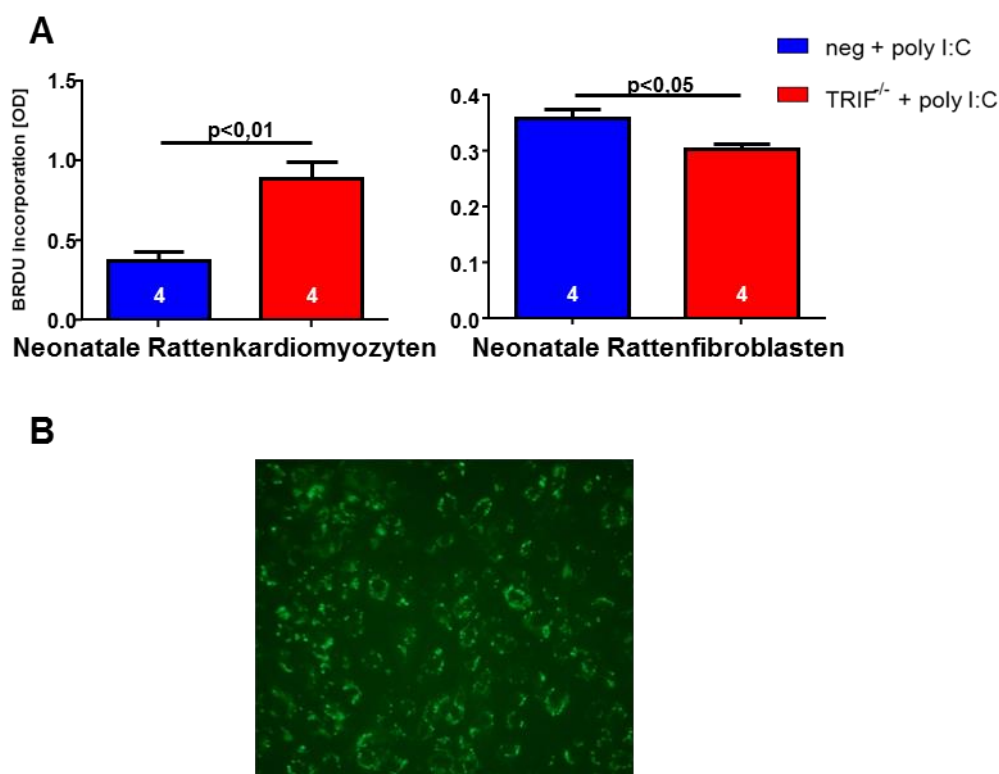


Abbildung 34: TRIF knock down unterstützt die Proliferation von Kardiomyozyten und hemmt die Proliferation von Fibroblasten

Neonatale Rattenkardiomyozyten und-fibroblasten (A) wurden mit TRIF-siRNA bzw. einer negativen Kontroll-siRNA für 48h transfiziert. Eine Optimierung des knockdown Effekts wurde durch die Stimulation der Zellen mit poly I:C in den letzten 16h erreicht. Abb. B zeigt exemplarisch eine Transfektion mit fluoreszenzmarkierter siRNA. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit in den Balken angegebener n-Zahl; Statistik: ungepaarter T-Test).

4.15. Funktionelle Beurteilung: Echokardiographie und Working Heart

4.15.1. Echokardiographie

Die Echokardiographie gibt Auskunft über die Auswirkungen der Nachlasterhöhung auf die Hämodynamik. Dazu wurden echokardiographische Messungen an Tag 0, Tag 7 und an Tag 35 durchgeführt. Die Daten zeigen, dass die Abwesenheit von TRIF tendenziell zu dem frühen Zeitpunkt die Entwicklung der Myokardhypertrophie bremst. Bei der linksventrikulären Masse und Wanddicke zeigte sich besonders deutlich, dass das hypertrophe Remodeling bei den Wildtypmäusen deutlich früher in Gang gesetzt wird als in den TRIF defizienten TAC-Mäusen. Während in den Wildtyptieren die linksventrikuläre Hinterwanddicke (LVPW; d) (Abbildung 36A) bereits früh (Tag 7) signifikant zunahm (C57BL/6J Sham = $0,64 \pm 0,02$ mm; C57BL/6J TAC = $0,79 \pm 0,06$ mm; $p < 0,5$; TRIF^{-/-} Sham = $0,64 \pm 0,03$ mm; TRIF^{-/-} TAC = $0,65 \pm 0,04$ mm; $p = \text{n.s.}$), genauso wie die damit assoziierte relative Zunahme der linksventrikulären Masse (LV mass) (C57BL/6J Sham = $1,00 \pm 0,04$; C57BL/6J TAC = $1,45 \pm 0,07$; $p < 0,001$; TRIF^{-/-} Sham = $1,00 \pm 0,02$; TRIF^{-/-} TAC = $1,16 \pm 0,08$; = n.s.) (Abbildung 35B), war die Zunahme der linksventrikulären Hinterwanddicke (C57BL/6J Sham = $0,64 \pm 0,02$ mm, C57BL/6J TAC = $0,74 \pm 0,05$ mm; $p < 0,01$; TRIF^{-/-} Sham = $0,65 \pm 0,02$ mm TRIF^{-/-} TAC = $0,73 \pm 0,03$ mm; $p < 0,001$) und Ventrikelmasse (C57BL/6J Sham = $1,20 \pm 0,05$. C57BL/6J TAC = $1,62 \pm 0,14$; $p < 0,001$; TRIF^{-/-} Sham = $1,19 \pm 0,05$; TRIF^{-/-} TAC = $1,50 \pm 0,08$; $p < 0,001$) bei den TRIF^{-/-}-Mäuse erst an Tag 35 bemerkbar. Ebenso trat eine Verringerung der prozentualen Auswurfraction („Ejection Fraction“, EF [%]) in den TRIF^{-/-}-Mäuse erst zu einem späteren Zeitpunkt als bei den Wildtypen ein (d7: C57BL/6J Sham = $40,33 \pm 1,44\%$; C57BL/6J TAC = $39,34 \pm 1,69\%$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $42,31 \pm 1,51\%$; TRIF^{-/-} TAC = $42,76 \pm 1,97\%$; $p = \text{n.s.}$, d35: C57BL/6J Sham = $40,80 \pm 2,59\%$; C57BL/6J TAC = $38,03 \pm 1,57\%$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $41,54 \pm 2,37\%$; TRIF^{-/-} TAC = $36,64 \pm 2,42\%$; $p = \text{n.s.}$) (Abbildung 36). Die Septumdicke und die Dicke der Vorderwand waren in den Tiergruppen nach Behandlung vergleichbar. Weitere Parameter waren für eine eindeutige Aussage aufgrund großer Streuung der Einzelwerte nicht verwertbar.

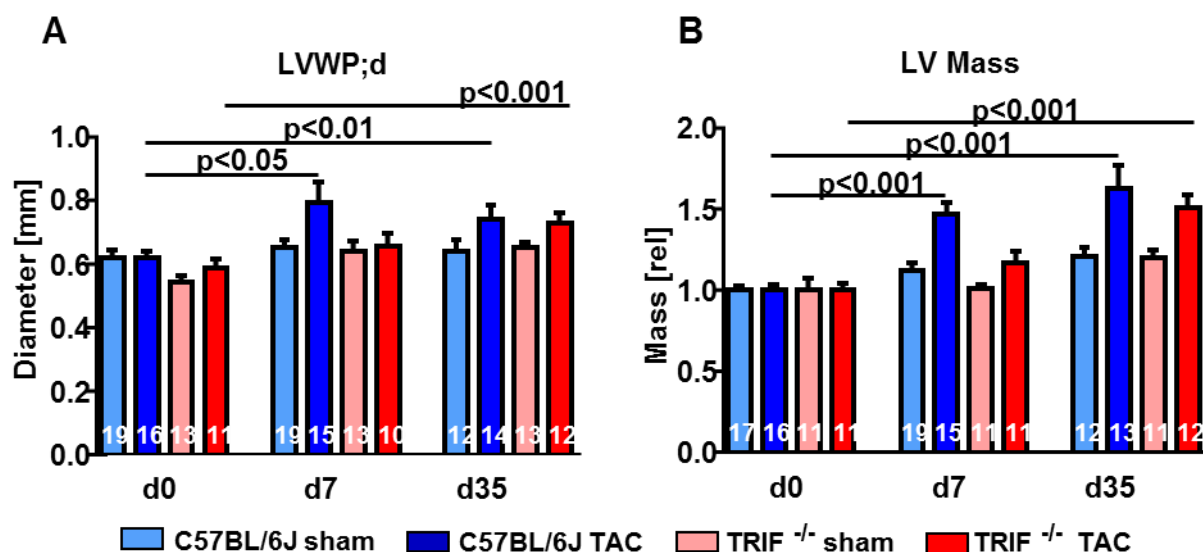


Abbildung 35: Echokardiographische Bestimmung der linksventrikulären Wanddicke und der linksventrikulären Masse

Während bei den TAC-operierten Wildtypmäusen bereits an Tag 7 eine signifikante Dickenzunahme der linksventrikulären Hinterwand (A) und der linksventrikulären Masse (B) zu verzeichnen war, erfolgte die Modulation dieser Parameter in den TRIF^{-/-}-Tieren erst zeitverzögert und war erst an Tag 35 signifikant und ähnlich ausgeprägt wie in den Wildtypen. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

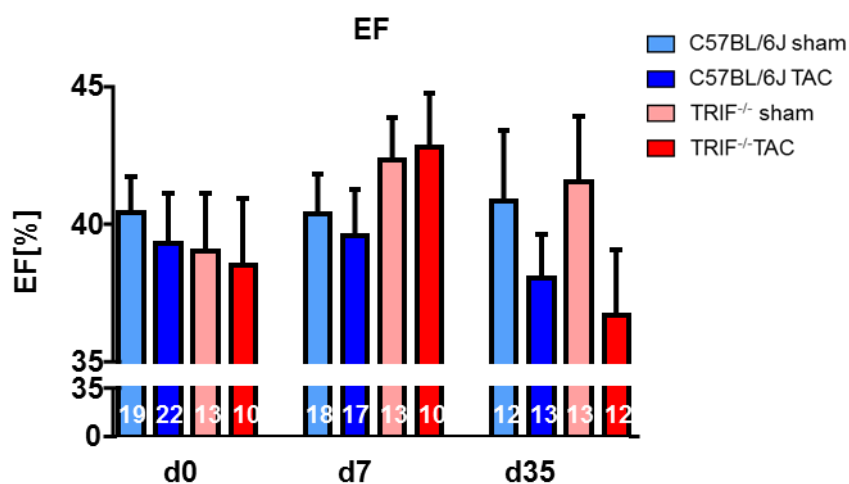


Abbildung 36: Modulation der prozentualen Auswurfraction (Ejection Fraction, EF, Echokardiographie)

Während bereits in den Wildtypmäusen die EF nach TAC tendenziell verringert war, zeigte sich eine eingeschränkte Pumpfunktion bei den TRIF^{-/-}-Tieren erst an Tag 35. Zu diesem Zeitpunkt waren die Werte in den beiden Gruppen vergleichbar. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

4.15.2. Working Heart

Als zweite Messmethode wurde die Funktionalität der Herzen an Tag 35 und an Tag 70 in der Langendorff Perfusionsanlage im Working Heart Mode untersucht. Bei der Entnahme der Herzen zeigte sich, dass es bei den C57BL/6J-Tieren weit häufiger zu einer Verwachsung des OP-Fadens mit dem Thorax kam als bei den TRIF^{-/-}-Mäusen. Diese Verwachsungen erschwerten die Präparation erheblich und es verblieb von den gebandeten 70d-Wildtyp-Tieren nur eine geringe Anzahl für die Messung (C57BL/6J TAC: 4 verblieben von 11, TRIF^{-/-} TAC: 8 verblieben von 11). Trotz der daraus resultierenden geringen „n“-Zahlen und erheblicher Streuungen in den Messwerten zeigte sich in den Mäusen mit Nachlasterhöhung deutlich eine Verschlechterung der diastolischen Parameter. Die systolischen Werte waren hingegen weitgehend unverändert. Auch mit dieser Methode konnte eine Verringerung der Ejection Fraction (Abbildung 37) nachgewiesen werden. Wobei sich auch hier kein Unterschied zwischen Wildtyp und TRIF^{-/-} zu verzeichnen war. (d35: C57BL/6J Sham = $46,74 \pm 5,67\%$; C57BL/6J TAC = $39,67 \pm 6,05\%$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $45,15 \pm 7,02\%$; TRIF^{-/-} TAC = $39,03 \pm 6,66\%$; $p = \text{n.s.}$, d70: C57BL/6J Sham = $44,81 \pm 7,56\%$; C57BL/6J TAC = $35,66 \pm 7,19\%$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $49,32 \pm 3,12\%$; TRIF^{-/-} TAC = $44,21 \pm 4,36\%$; $p = \text{n.s.}$). Eine Modulation der hämodynamischen Effekte war auch bei der Herzauswurfleistung (Abbildung 38A) und dem damit verbundenen Schlagvolumen (Abbildung 38B) zu sehen. Diese Modulationen waren bei den 35-Tagen-Tieren noch nicht zu sehen, sondern waren erst bei den 70 Tage-Tieren ausgeprägt. Aber auch hier war weder die Herzauswurfleistung (cardiac output) (d35: C57BL/6J Sham = $6,60 \pm 0,44 \text{ ml/min}$; C57BL/6J TAC = $6,63 \pm 1,21 \text{ ml/min}$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $5,15 \pm 0,60 \text{ ml/min}$; TRIF^{-/-} TAC = $6,43 \pm 0,69 \text{ ml/min}$; $p = \text{n.s.}$, d70: C57BL/6J Sham = $8,43 \pm 0,86 \text{ ml/min}$; C57BL/6J TAC = $5,22 \pm 0,77 \text{ ml/min}$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $10,41 \pm 0,57 \text{ ml/min}$; TRIF^{-/-} TAC = $6,63 \pm 0,64 \text{ ml/min}$; $p > 0,01$) noch das Schlagvolumen (d35: C57BL/6J Sham = $16,94 \pm 1,56 \mu\text{l}$; C57BL/6J TAC = $17,14 \pm 3,12 \mu\text{l}$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $13,34 \pm 0,89 \mu\text{l}$; TRIF^{-/-} TAC = $14,49 \pm 1,56 \mu\text{l}$; $p = \text{n.s.}$, d70: C57BL/6J Sham = $30,31 \pm 1,76 \mu\text{l}$; C57BL/6J TAC = $12,79 \pm 2,10 \mu\text{l}$; $p = \text{n.s.}$; TRIF^{-/-} Sham = $24,27 \pm 1,41 \mu\text{l}$; TRIF^{-/-} TAC = $15,81 \pm 1,51 \mu\text{l}$; $p = \text{n.s.}$) zwischen den beiden Tiergruppen unterschiedlich.

Ergebnisse

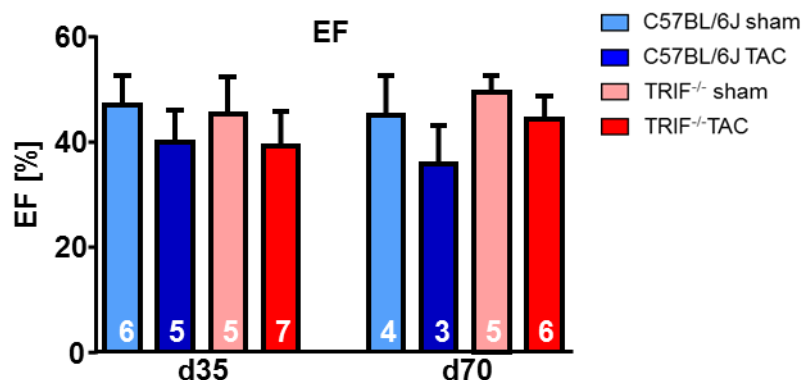


Abbildung 37: Modulation der prozentualen Auswurffraktion (Ejection Fraction, EF; Working Heart)

Sowohl in den Wildtyp-Tieren als auch in den TRIF^{-/-}-Tieren war an Tag 35 die EF nach TAC tendenziell verringert. Diese eingeschränkte Pumpfunktion war auch an Tag 70 zu sehen. Zu beiden Zeitpunkten waren die Werte in den beiden Gruppen aber vergleichbar. (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

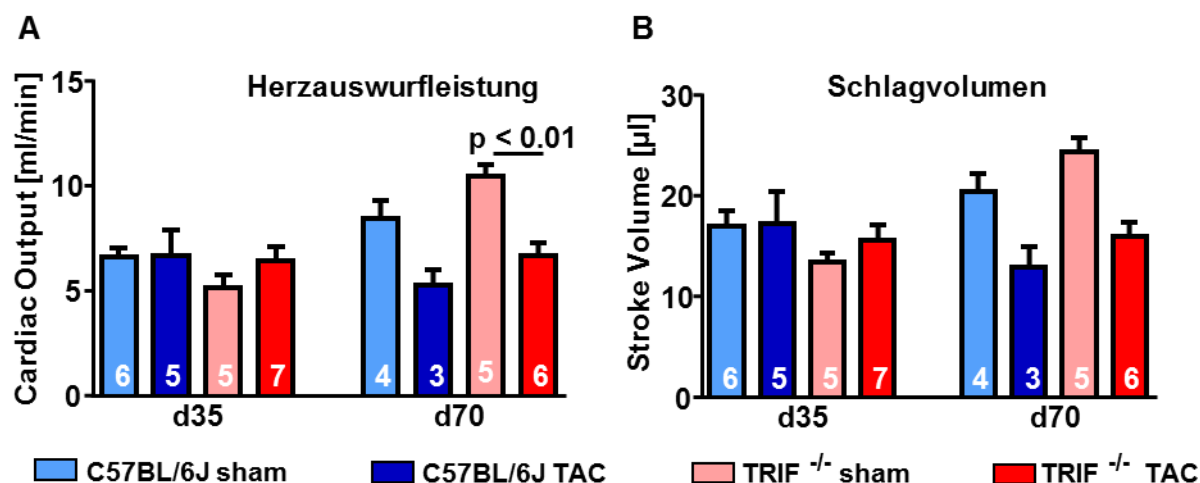


Abbildung 38: Herzauswurfleistung und Schlagvolumen im Working Heart Mode

Eine Reduktion der diastolischen Pumpfunktion zeigte sich erst sehr spät (70 Tage nach TAC) durch verminderte Herzauswurfleistung (A) und vermindertes Schlagvolumen (B). (Darstellung: Mittelwert \pm SEM mit der Anzahl der untersuchten Tiere in den Balken; Statistik: Two-Way-Anova Analyse und Bonferroni Post-hoc).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte am etablierten Mausmodell der transaortalen Konstriktion (TAC) gezeigt werden, dass eine vermehrte kardiale Druckbelastung bereits innerhalb weniger Stunden zu einem Anstieg von MyD88- und der TRIF-abhängigen Zytokinen im Herzen führt. An TRIF-defizienten Mäusen ließ sich nachweisen, dass nachlastinduzierte linksventrikuläre Hypertrophie nicht TRIF-abhängig ist, TRIF aber im frühen Stadium des kardialen Remodelings die vermehrte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine sowie die Einwanderung inflammatorischer Zellen induziert. Es konnte belegt werden, dass der TRIF Signalweg bei der Entstehung der nachlastinduzierten kardialen Fibrose involviert ist und dabei an unterschiedlichsten Stellen der Signalweiterleitung regulierend einwirkt. Die mit dem maladaptiven Remodeling einhergehende pathologische Veränderung der Funktionalität des Herzens wird auf lange Sicht durch das Ausschalten von TRIF wenig beeinflusst, wenngleich das Remodeling zu Beginn verlangsamt ist und die funktionellen Parameter länger auf dem Normalniveau bleiben.

5.1. Inflammation und Hypertrophie

Die pathologische Hypertrophie ist die Folge einer Mehrbelastung des Herzens. Um die kardiale Funktion aufrecht zu erhalten, werden primär adaptive Umbauprozesse initiiert. Sie dienen der Kompensation von erhöhter systolischer oder diastolischer Wandspannung, hervorgerufen durch chronische Druck- oder Volumenbelastung, neurohumorale Überaktivierung und erhöhte sympathische Aktivität. Bei anhaltender chronischer Belastung wird der adaptive Effekt immer geringer und maladaptive Effekte überwiegen immer mehr. Die Folge sind myokardiale Fibrose, ventrikuläre Dilatation und kontraktile Dysfunktion. Kardiales Remodeling, das der pathologischen Hypertrophie zugrunde liegt, ist komplex und die Entstehung der pathologischen Hypertrophie ist multifaktoriell. Neben hypertrophen, fibrotischen, apoptotischen Ereignissen spielen vor allem inflammatorische Prozesse eine Rolle.

Inflammation ist direkt und indirekt an Erkrankungen des Herzens beteiligt. In Folge inflammatorischer Auslöser kann es am Herzen zu infektiös entzündlichen Krankheitsbildern wie Endokarditis, Myokarditis oder Perikarditis kommen (BEN-HAIM et al., 2009). Inflammation ist aber auch grundlegend bei der Pathogenese und Progredienz kardialer Erkrankungen (Kardiomyopathien) und vaskulärer

Erkrankungen (endotheliale Dysfunktion, Atherosklerose) beteiligt (MANN, 2002). Bereits 1990 zeigten Levine et al. (LEVINE et al., 1990), dass Herzinsuffizienz und Inflammation miteinander in Verbindung stehen.

Inflammation spielt somit eine wichtige Rolle beim adaptiven und maladaptiven Remodeling des Herzens. Als Folge einer linksventrikulären Überbelastung kommt es zu myokardialer Inflammation mit der Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Leukozyteninfiltration. Screeningstudien an Mensch und Tier zeigten einen Zusammenhang zwischen proinflammatorischen Markern und nachlastinduzierter Hypertrophie und Fibrose (DAMAS et al., 2000; GULLESTAD, AUKRUST, 2005; MANN, 2002).

Es ist hervorzuheben, dass die im Verlauf einer Herzinsuffizienz aktivierten inflammatorischen Signalkaskaden und Prozesse sich nicht nur maladaptiv auf die Krankheitsprogression auswirken müssen, sondern können gleichermaßen adaptiv modulierend einwirken (KINDERMANN et al., 2008; PACKARD et al., 2009). Die pathologische Myokardhypertrophie ist ein früher Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen, um die Entstehung einer Herzinsuffizienz zu verhindern. Die in diesem Projekt untersuchten vielfältigen Einflüsse inflammatorischer Signalwege im Rahmen einer nachlastinduzierten Hypertrophie können deshalb den Anstoß für vielversprechende Ansätze liefern.

5.2. Nachlasterhöhung steigert die Expression inflammatorischer Zytokine im Myokard nur zum frühen Zeitpunkt

Die Herzinsuffizienz ist charakterisiert durch erhöhte Zytokin-Serumspiegel. So ist in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ein erhöhter TNF-alpha-Serumspiegel zu finden. Die TNF-alpha-Spiegel von Patienten mit Herzinsuffizienz können sogar direkt mit dem Grad der Herzinsuffizienz in Relation gesetzt werden. Wie Bozkurt et al. (BOZKURT et al., 2010) und Torre-Amione et al. (TORRE-AMIONE et al., 1996) zeigten, ist die klinische Herzfunktion (definiert über die NYHA Klassifizierung) negativ mit der TNF-alpha-Konzentration im Serum korreliert. Aufgrund dieser Erkenntnisse gibt es bereits vielzählige Untersuchungen, um den inflammatorischen Signalweg bei der Herzinsuffizienz aufzuklären und hier einen entsprechenden Therapieansatz zu finden (DAMAS et al., 2000; DESWAL et al., 2001; GULLESTAD,

AUKRUST, 2005; MANN, 2005). In den hier zitierten Studien lag der Schwerpunkt auf den zirkulierenden Zytokinspiegeln im Serum. Es stellt sich die Frage, wie sich die Zytokinspiegel beim hypertrophen Remodeling im Myokard selbst verändern, zu welchem Zeitpunkt das Expressionsmaximum erreicht wird und welchen Einfluss die lokale Veränderung der Zytokinexpression hat. In diesem Zusammenhang untersuchten wir Zytokinexpression im Myokard im Verlauf nach Nachlasterhöhung durch Aortenligatur. Dazu wurde von TAC (Transaortaler Konstriktion)-operierten C57BL/6-Mäusen 16 Stunden, 3, 7 und 35 Tage nach OP die Zytokinexpression bestimmt. Es zeigte sich, dass sowohl MyD88-abhängige als auch MyD88-unabhängige, also TRIF-abhängige, Zytokine in der Regel am Tag 3 bzw. 7 ihr Expressionsmaximum erreichten. Man muss bei der Interpretation der Daten mit berücksichtigen, dass die zur Nachlasterhöhung nötige Operation an sich ein Auslöser für Inflammation ist und der Zytokinexpression zu den ganz frühen Zeitpunkten (16 Stunden und 3 Tage post Op) neben frühem kardialen Remodeling auch Wundheilungsprozesse zugrunde liegen. An Tag 7 kann davon ausgegangen werden, dass die gesteigerte Zytokinexpression nicht mehr durch operative Effekte gesteuert wird, sondern aufgrund der veränderten Druckverhältnisse im Herzen ausgelöst wird. Zytokinvermitteltes inflammatorisches Remodeling scheint hauptsächlich im frühen Hypertrophiestadium eine Rolle zu spielen. Zum Zeitpunkt einer voll ausgeprägten Hypertrophie, was in unserem Versuchsaufbau Tag 35 entspricht, war bei fast allen Zytokinen die Expression wieder auf dem Niveau der Kontrollen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei späteren Zeitpunkten der nachlastinduzierten Hypertrophie andere Faktoren und Signalwege für die Progredienz der Herzerkrankung verantwortlich sind.

5.3. Nachlast-induzierte Hypertrophie ist weitestgehend TRIF-unabhängig

Die Verringerung des Aortendurchmessers um ca. 60 % (TAC-OP) bewirkt eine Nachlasterhöhung und damit Druckbelastung des Herzens und dient als Auslöser einer linksventrikulären Hypertrophie. Wie erwartet war bei den Wildtyp- und den TRIF-defizienten Mäusen bereits an Tag 7 nach TAC-OP eine deutliche Hypertrophie ausgebildet. Die (mal)adaptiven Remodelingvorgänge äußerten sich in einer Vergrößerung der Kardiomyozyten, einer erhöhten Herzgewicht/Körpergewichts-Ratio sowie in einer erhöhten Expression fetaler Gene (Abbildung 18). Diese

Ergebnisse decken sich mit denen von Nakumura et al., die zeigten, dass sich nach TAC eine linksventrikuläre Hypertrophie schnell entwickelt und bereits an Tag 10 messbar ist (NAKAMURA et al., 2001). Bereits 1991 wurde gezeigt, dass bei Verwendung einer 27G Nadel und einem Tieralter von 8 Wochen 7 Tage nach TAC eine Zunahme der linksventrikulären Masse um 41 % vorliegt (ROCKMAN et al., 1991). Der Vergleich des Hypertrophiegrades zwischen den beiden von uns untersuchten Tiergruppen zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der Hypertrophie. Zwar waren am Tag 7 tendenziell die morphologischen Hypertrophiemarker und die Expression fetaler Gene bei den Wildtyptieren höher als bei den TRIF-defizienten Mäusen, aber an Tag 35 war keiner dieser typischen Hypertrophieparameter in den beiden Gruppen unterschiedlich und die Hypertrophie demzufolge gleich ausgeprägt. Im Gegensatz dazu fand Singh et al. bei der Angiotensin II induzierten kardialen Hypertrophie nach drei Wochen Behandlungszeitraum in TRIF-defizienten Mäusen eine deutlich geringer ausgeprägte Hypertrophie (Herzgewicht/Körpergewicht) als in den Kontrolltieren (SINGH et al., 2015). Neben Angiotensin II sind auch TLR4-getriggerte Signalkaskaden bei der linksventrikulären Hypertrophie involviert (JIANG et al., 2014). Der TLR4/TRIF-Signalweg scheint dabei im Gegensatz zum TLR4/MyD88-Signalweg nur eine untergeordnete Rolle für das Entstehen der linksventrikulären Hypertrophie zu spielen (LI et al., 2005).

5.4. Die Einwanderung von inflammatorischen Zellen ist zum frühen Zeitpunkt der Nachlasterhöhung TRIF-abhängig

Inflammatorische Prozesse sind charakteristisch für eine Herzinsuffizienz. Insbesondere die Sezernierung von Zytokinen als inflammatorischer Modulatoren spielt eine Rolle bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz. In diesem Zusammenhang interessiert, welche im Myokard befindlichen Zellen für die erhöhte Zytokinexpression und für die Aktivierung des kompensatorischen Remodelings wie zum Beispiel den Umbau der Extrazellulären Matrix (EZM) verantwortlich sind. Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der durch die Immunaktivierung ausgelösten Einwanderung inflammatorischer Zellen ins Myokard sollte darüber weiter Auskunft geben. In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass eine erhöhte transendotheliale Migration von Monozyten in das Herz mit einer Veränderung der

EZM und folgender Progression der Herzinsuffizienz assoziiert ist (BRYANT et al., 1998; HEYMANS et al., 2009; KUBOTA et al., 1997). Unsere Ergebnisse zeigten, dass das Fehlen von TRIF Einfluss auf die Migration von CD3⁺ T-Lymphozyten und F4/80⁺ -Makrophagen hat. Die Einwanderung beider Zelltypen ins Myokard war bei den TRIF-defizienten Tieren nach sieben Tagen TAC im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich verringert. Neueste Daten zeigen, dass TRIF die Einwanderung von Makrophagen begünstigt (CHEN et al., 2015a) und bestätigen somit unsere Ergebnisse. Die Daten von Chen et al. zeigten, dass eine TRIF-abhängige erhöhte Expression von CCL2 und CXCL10, wie sie auch von uns gesehen wurde (Abbildung 22), zur Steigerung der chemotaktischen Eigenschaften führt. Richards et al. konnten belegen, dass das Fehlen von TRIF bei Atherosklerose zu einer reduzierten Akkumulation von CD68⁺-Makrophagen im Sinusknoten führt. Somit kann durchaus davon ausgegangen werden, dass die Infiltration von inflammatorischen Zellen TRIF-abhängig ist und dadurch die lokale Ausprägung der Immunantwort und die Zytokinexpression beeinflusst werden können.

5.5. TRIF hat lokal Einfluss auf die durch Nachlasterhöhung induzierte myokardiale Zytokinexpression

In anschließenden Versuchen wurde an TRIF-defizienten Mäusen die TRIF-abhängige Zytokinexpression zum frühen Zeitpunkt (d7) nach TAC und zum Zeitpunkt der manifestierten Hypertrophie (d35) spezifiziert. Dabei sollte geklärt werden, inwieweit das Fehlen von TRIF die Zytokinexpression beeinflusst und inwieweit sich die lokale myokardiale Zytokinexpression von der im peripheren Blut unterscheidet. Dies ist insoweit wichtig, da Zytokine nicht nur für auto- und parakrine Effekte im Myokard verantwortlich sind, sondern auch als endokrine Effektoren für zahlreiche Wirkungen im gesamten Körper dienen (FUCHS, DREXLER, 2004).

Die Untersuchung der Zytokinexpression aus myokardialer mRNA zeigte, dass durch Druckbelastung des Herzens und dem Fehlen von TRIF nicht nur die TRIF-abhängigen, sondern auch die MyD88-abhängigen Zytokine im Myokard herunterreguliert werden. Dies zeigte sich am deutlichsten bei IL6, CCL2 und TNF-alpha. Hingegen war die Expression von MyD88-abhängigen Zytokinen in isolierten Monozyten aus der Milz in beiden Tiergruppen gleich und nicht durch TRIF

beeinflusst. Bei den TRIF-abhängigen Zytokinen war in den TRIF-defizienten Mäusen eine Herabregulation lokal im Myokard als auch in der Peripherie zu sehen, Im Gegensatz dazu war die Expression TRIF-abhängiger Zytokine nach TAC in den Kontrolltieren signifikant erhöht. Aber auch hier war der lokale Effekt im Herz deutlich mehr ausgeprägt als in den Zellen der Milz. Daraus lässt sich schließen, dass TRIF vor allem einen lokalen Einfluss auf inflammatorische Modulatoren hat und dass lokal auch MyD88-abhängige Zytokine indirekt durch TRIF reguliert werden.

Alle diese Daten untermauern die Hypothese, dass eingewanderte inflammatorische Zellen (T-Zellen und Makrophagen) eine wichtige Rolle bei der Induktion der nachlastinduzierten Immunantwort im Myokard spielen. Weiterhin scheint aber im Verlauf durch verstärkte Gegenregulation der adaptive Effekt, der beim Fehlen von TRIF im frühen Zeitpunkt des Remodelings zu sehen ist, kompensiert zu werden (XIA et al., 2009a) und somit längerfristig, wie in Punkt 5.3 beschrieben, keinen signifikanten Einfluss auf die Progredienz des hypertrophen Phänotyps bzw. auf funktionelle Parameter zu haben.

5.6. TRIF moduliert profibrotische Vorgänge im frühen Remodeling

Wie unsere Ergebnisse zeigen (siehe 4.3), hat TRIF keinen Einfluss auf die Hypertrophie der Kardiomyozyten. Trotzdem konnten wir gleichzeitig nachweisen, dass die Herzgewicht/Körpergewichts-Ratio bei den TRIF-defizienten Mäusen 7 Tage nach Nachlasterhöhung deutlich kleiner war als bei den Kontrolltieren. Das geringer erhöhte Herzgewicht der TRIF^{-/-}-Mäuse zum frühen Zeitpunkt kann eine Folge unterschiedlich ausgeprägter Initiation des kompensatorischen Umbaus der Herzwände verbunden mit Apoptose und/oder kardialer Fibrose sein.

Fibrose stellt neben der Hypertrophie mit den wichtigsten Prozess beim maladaptiven Remodeling dar (BROWN et al., 2005; CINGOLANI et al., 2004). Wie auch bei Ying et al. (XIA et al., 2009a) war in unseren gebandeten Tieren bereits nach sieben Tagen ein erhöhter Kollagengehalt des Myokards messbar. Die Zunahme des Kollagengehalts war bis zum Tag 35 in beiden Mausgruppen zu verzeichnen. Jedoch zeigten die Wildtypmäuse am frühen und am späten Zeitpunkt eine signifikante Steigerung des Kollagengehaltes, während die Zunahme in den TRIF-defizienten Tieren deutlich moderater ausfiel. Im Gegensatz zu allen bis hierher

beschriebenen Parametern, kam es hier nicht zu einer Angleichung der Werte zum späten Zeitpunkt. Die vermehrte Fibrose in den Wildtypmäusen war histologisch in der Picro-Siriusred-Färbung zu sehen. Fibrose-assoziierte Parameter wie ein höherer Hydroxyprolingehalt des Gewebes und auf molekularer Ebene die höhere Kollagen 1alpha-Expression in den Wildtyptieren rundeten das Bild ab. Diese Befunde legen nahe, dass das Fehlen von TRIF maladaptives Remodeling in Bezug auf fibrotische Ereignisse mildert.

Neueste Daten (CHEN et al., 2015a; CHEN et al., 2015b) zeigen, dass TRIF beim Angiotensin II- induziertem Cross-Talk zwischen atrialen Fibroblasten und Makrophagen involviert ist und somit innerhalb eines positiven Feedback-Loops an der Entstehung von atrialer Fibrose beteiligt ist. Bekannterweise spielen inflammatorische Mediatoren eine wichtige Rolle bei fibrotischem Remodeling (FRANGOIANNIS, 2008). Ebenso wie Frangogiannis zeigten auch Xia et al., dass die Chemokinexpression mit dem Grad der Fibrose assoziiert ist. Beide Arbeitsgruppen sahen genau wie wir eine Erhöhung von CCL2 und CXCL10 nach Nachlasterrhöhung. Xia et al. spekulierte beim druckbelasteten Herzen im zeitlichen Verlauf der Remodelingvorgänge ein Wechsel von der inflammatorischen zur fibrotischen Zellantwort (XIA et al., 2009b). Diese Vermutung legt wiederum die Schlussfolgerung nahe, dass weniger Inflammation zu weniger Fibrose führt.

5.7. Potentieller Signalweg für TRIF-abhängiges maladaptives Remodeling

Die bisher diskutierten morphologischen, histologischen und molekularbiologischen Ergebnisse weisen darauf hin, dass der TRIF-Signalweg die Fibrosierung als Folge einer erhöhten Druckbelastung des Herzens beeinflusst. Welche Signalwege dabei über den TRIF-Signalweg angeschaltet oder gehemmt werden, war die nächste Frage dieser Arbeit.

5.7.1. TGF-beta und TGF-beta regulierte Signalwege werden durch den TRIF moduliert

TGF-beta (Transforming growth factor) ist bei in einer Vielzahl von Zellen und Geweben bei der Regulation des Zellwachstums, -Differenzierung und -Reparatur

involviert (BARNARD et al., 1990) und beeinflusst dadurch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Es ist bekannt, dass TGF-beta bei der myokardialen Zellantwort auf hypertrophe Stimuli beteiligt ist (TAKAHASHI et al., 1994; VILLARREAL, DILLMANN, 1992). Dabei kann TGF-beta das fetale Genprogramm in Kardiomyozyten reaktivieren (PARKER et al., 1990) und die Kollagenproduktion der Fibroblasten stimulieren (EGHBALI et al., 1991). Wie in der Literatur beschrieben, zeigte sich auch in den TAC-Mäusen der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der TGF-beta-Proteinexpression, die bei den TRIF-defizienten Mäusen deutlich moderater ausfiel. Im Gegensatz zu den inflammatorischen Parametern, war der Unterschied der TGF-beta-Proteinexpression in den beiden Tiergruppen auch noch an Tag 35 deutlich ausgeprägt (Abbildung 27).

In diesem Zusammenhang versuchten wir, den für die unterschiedliche TGF-beta-Expression verantwortlichen Zelltyp zu definieren. In-vitro Versuche mit TRIF-siRNA an neonatalen Rattenfibroblasten, -Kardiomyozyten und THP1-Zellen (Makrophagen) zeigten, dass das Fehlen von TRIF auf alle drei Zelltypen vergleichbare Auswirkungen hat und sich bei allen die TGF-beta-Expression auf die Hälfte reduzierte (Abbildung 28).

Casscells et al. konnten zeigen, dass eine TGF-beta Überexpression in transgenen Mäusen zu einer signifikanten Hypertrophie mit ausgeprägter interstitieller Fibrose führt (CASSCELLS et al., 1990). Dobaczewski et al. diskutierten, dass es aber nicht nur darauf ankommt, dass TGF-beta vermehrt vorliegt, sondern, dass es ebenfalls zu einer Aktivierung des TGF-beta Signalings kommen muss, dies bisher aber noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (DOBACZEWSKI et al., 2011).

Dem TGF-beta Signalweg kommt eine zentrale Rolle im hypertrophen Remodeling zu, da über die Aktivierung dieses Signalweges die Modulation der Proliferation und des Zellüberlebens reguliert werden kann. Dies erfolgt über die TGF-beta Rezeptorbindung ausgelöste Phosphorylierung von R-Smads (Rezeptor-Smads, Smad 2,3) und der Komplexbildung mit Smad 4 (Common-Mediator, Co-Smad). Dieser Komplex kann in den Zellkern translozieren und durch Erkennung von spezifische Co-Aktivatoren (DNA binding Proteine, DBPs) die Genexpression verstärken oder vermindern (ATTISANO, WRANA, 2002).

Diskussion

Wir konnten zeigen, dass in Wildtypmäußen im Gegensatz zu den TRIF-defizienten Mäusen Smad 3 und 4 an Tag 7 nach TAC deutlich erhöht waren (Abbildung 29) und sowohl in der Gesamtfraktion als auch in der nukleären Kernfraktion eine vermehrte Aktivierung von Smad 3 (phosphoryliertes Smad3) nachzuweisen war. Während an Tag 35 die Menge von phosphoryliertem SMAD 3 in den Wildtypmäusen wieder auf Kontrollniveau war, kam es in den TRIF ko-Mäusen deutlich verzögert zu einer Aktivierung von Smad 3. Diese verzögerte Aktivierung des Smad-Signalwegs legt nahe, dass der protektive Einfluss, hier die Inhibition der Inflammation über die Smad Signalkaskade, zu diesem späten Zeitpunkt durch andere Faktoren kompensiert wird. Auch wenn der Effekt nur kurzzeitig auftritt, belegen diese Daten, dass neben der TRIF-abhängigen Regulation von TGF-beta auch der TGF-beta abhängige Smad-Signalweg reguliert wird.

Ob TRIF spezifische Smads zusätzlich direkt reguliert, versuchten wir über die Bestimmung der miR-146a-Expression näher zu beleuchten. Smad 4 zählt zu den potentiellen Zielgenen von miR-146a und ist ein Linker zwischen Smad 4 und TGF-beta (ZHONG et al., 2010). Auffällig war, dass die TRIF-defizienten Mäuse bereits in der Sham-Gruppe einen 5-fach höhere miR-146a Expression aufwiesen, die auch nach TAC-OP nicht verändert war. In den Wildtypmäusen stieg nach TAC die Expressionsrate an, blieb aber unter dem Niveau der TRIF-defizienten Tiere. Diese Tatsache könnte erklären, dass durch den hohen miR146a-Level die Smad 4 Expression in den TRIF-Tieren trotz Druckerhöhung im Herz auf Kontrollniveau gehalten wird und der TGF-beta/Smad-Signalweg somit deutlich gehemmt wird und infolge davon das maladaptive Remodeling gebremst wird. Zu diesem Kontext passt, dass bei einer Phenylephrin-induzierten Hypertrophie die Überexpression von Smad 4 die Induktion von Apoptose triggern kann. Erhöhte Smad-Expression hat in diesem speziellen Fall die Fähigkeit, das hypertrophe Wachstumssignal in einen apoptotischen Stimulus umwandeln und somit maladaptives Remodeling zu unterstützen (HEGER et al., 2009). Auch wir vermuteten, dass durch die TRIF-regulierte Smad-Signalkaskade Fibrose und Apoptose moduliert werden. Smad 4 spielt eine Rolle beim hypertrophen Signaling, scheint aber keine Schlüsselrolle einzunehmen. Denn Wang et al. konnten darstellen, dass das Fehlen von Smad 4 nicht zu einer verminderten kardialen Hypertrophie führt (WANG et al., 2005). Diese Erkenntnis bestätigt unsere Beobachtungen, dass TRIF die Ausprägung der

Hypertrophie nicht beeinflusst (siehe 5.9) obwohl anscheinend Smad durch TRIF reguliert wird.

Unsere weiteren Ergebnisse zeigten, dass die Proteinkinase B (Akt), ein weiterer wichtiger Bestandteil zellulärer Signalkaskaden, in den beiden Tiergruppen in gleicher Menge exprimiert wird. Am frühen Zeitpunkt war die aktive Form in den TRIF^{-/-}-Mäusen nach Nachlasterhöhung höher nachweisbar als in der gleichen Gruppe der Wildtypmäuse. Da Akt ein Proteinkinase ist, die in vielen Signalwegen eingebunden ist, kann man generell davon ausgehen, dass eine gesteigerte Akt-Aktivität ein Hinweis auf eine insgesamt erhöhte proliferatorische Aktivität im Myokard der TRIF-defizienten Mäuse ist. Bekannt ist, dass Akt bei der adaptiven kardialen Hypertrophie benötigt wird (DEBOSCH et al., 2006). Auch scheint sie nach Vorlasterhöhung in der Frühphase das Herz zu schützen und die Entstehung einer linksventrikulären Dysfunktion zu verlangsamen (MOHAMED et al., 2015). Ebenso ist die schwangerschaftsinduzierte Hypertrophie Akt-mediiert (CHUNG et al., 1985). So bewirkt die Aktivierung von Akt zumindest bei einer entstehenden Hypertrophie eine Hemmung der Apoptose (CECI et al.).

5.7.2. Die Expression der antifibrotisch wirkenden miR-29 wird in TRIF-defizienten Mäusen positiv beeinflusst

MicroRNAs (miRNAs) sind nicht kodierende RNAs, die die Genexpression transkriptional regulieren. Viele Studien belegen ihre Wichtigkeit bei der Modulation unzähliger biologischer, unter anderem auch Fibrose-regulierender, Prozesse. Viele Gene der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Fibrillin und Elastin sind direkte Zielgene von miR-29 (VAN ROOIJ et al., 2008). Die Daten legen nahe, dass miR-29 ein wichtiger Faktor bei der Regulation der Fibrose ist (GLADKA et al., 2012). Gleichzeitig zeigten van Rooij et al., dass TGF-beta ein upstream Regulator von miR-29 ist (VAN ROOIJ et al., 2008). Durch Herunterregulation von miR-29 werden die Expression von Kollagenen und verstärkt die Fibrosebildung induziert (LIU et al., 2010). Somit ist die miR-29-Expression als anti-fibrotisch einzustufen und eine hohe Expression als positiv beim maladaptiven Remodeling zu sehen. Diesen positiven Effekt einhergehend mit einer erhöhten miR-29-Expression konnten wir bei den TRIF-defizienten Mäusen sehen. Dabei war der Grundspiegel der miRNA bereits

höher und es erfolgte ein deutlicher Expressionsanstieg nach TAC (Abbildung 30). Wie oben zitiert, verhindert die Hemmung von Smad 3 durch Akt die Translokation des Smad-Komplexes in den Nukleus und wirkt sich somit positiv auf das Zellüberleben aus. In diesem Zusammenhang wurde erkannt, dass miR-29 ebenfalls negativ von Smad 3 reguliert wird (ZHOU et al., 2012). Somit kann die verminderte Smad 3 - Expression in den TRIF-defizienten Mäusen verantwortlich sein für die fehlende Suppression von miR-29.

5.8. Die Abwesenheit von TRIF fördert die Proliferation und hemmt die Apoptose

Neben der Fibrosierung spielen beim maladaptiven Remodeling Apoptose und Proliferation eine wichtige Rolle (OLIVETTI et al., 1997). Im erwachsenen Herz besitzen die Kardiomyozyten keine bzw. kaum noch die Fähigkeit zur Proliferation. Deshalb untersuchten wir den Einfluss von TRIF an noch potentiell zur Proliferation befähigten neonatalen Rattenkardiomyozyten. In unseren in-vitro Versuchen resultierte aus dem Ausschalten von TRIF eine erhöhte Proliferationsrate der Kardiomyozyten. Dies bestätigt unsere Annahme, dass das Fehlen von TRIF sich positiv auf das Überleben der Kardiomyozyten auswirkt und das proliferatorische Potential der Zellen verbessert. Auch humane Endothelzellen der Aorta (HAoEC) zeigten ohne TRIF mehr Proliferation. Auch dies ist als positiv zu bewerten, da eine verbesserte Versorgung des Myokards durch eine vermehrte Kapillarbildung gewährleistet wird. Im selben Versuchsansatz konnten wir zeigen, dass im Gegensatz dazu neonatale Rattenfibroblasten durch das Fehlen von TRIF weniger proliferieren. Auch dies untermauert die in vivo Daten, die zeigen, dass die kardiale Fibrose in TRIF-defizienten Mäusen nach TAC weniger ausgeprägt ist.

Maladaptives Remodeling ist assoziiert mit Apoptose der Kardiomyozyten. Apoptose ist ein physiologischer, aktiver und engmaschig regulierter Prozess. Im druckbelasteten Herz ist die Expression proapoptotischer Zytokine wie TNF-alpha und TGF-beta (CHIEN, 1999) damit verbunden. Diese Zytokine waren in unserer Studie im hypertrophierenden Herz der Kontrolltiere hochreguliert (Abbildung 21, Abbildung 27). In den TRIF defizienten Mäusen blieb die Hochregulation der beiden proapoptotischen Zytokine aus.

Unsere Daten zeigen, dass der Signalweg, der zur Apoptose von Zellen führt, durch TRIF an mehreren Stellen moduliert wird. Das Fehlen von TRIF hat unter anderem Einfluss auf die TGF-beta-Expression bzw. das TGF-Signaling und wirkt sich zudem positiv auf die Expression von miR-29 aus, die in TRIF-defizienten Mäusen hochreguliert ist. Auch die erhöhte Aktivierung der Proteinkinase Akt und der damit verbundenen Suppression des Smad-Signalweges untermauert die Hypothese, dass die durch Druckerhöhung induzierte Apoptose der Kardiomyozyten durch eine TRIF-Defizienz gemildert wird und die Entstehung eines hypertrophen Phänotyps verlangsamt ist.

Um diese Hypothese noch weiter zu belegen, wurde die Proteinexpression von typischen Tumorsuppressorgenen untersucht, die auf zellulärer Ebene an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt sind. Inzwischen wurde eine Vielzahl von Genprodukten identifiziert, die die Apoptose regulieren. Das humane Tumorsuppressorgen p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. P53 war in den TAC-operierten Wildtypmäusen signifikant hochreguliert, während in den TRIF-Mäusen die Nachlastserhöhung nicht zu einer gesteigerten p53 Expression führte (Abbildung 32A, Abbildung 33A). Die wichtige Rolle von p53 beim maladapten kardialen Remodeling wurde bereits mehrfach beschrieben (SANO et al., 2007; WERNER et al., 2008). So zeigten Long et al., dass p53 nach Hypoxie-induzierter Apoptose in neonatalen Rattenkardiomyozyten hochreguliert wird (LONG et al., 1997). Auch Leri et al. fanden eine Aktivierung von p53 induziert durch dehnungs-induzierte Ausschüttung von Angiotensin II (LERI et al., 1998). P53 hat direkten Einfluss auf die Aktivierung von Bax, einem weiteren Tumorsuppressorgen. Bax gehört zur Bcl-2 Proto-Onkogenfamilie, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Apoptose einnimmt (REED, 1994). Die Bcl-2-Familie besteht aus zwei funktionellen Kategorien von Genen. Die eine Gruppe, wie Bcl-2, inhibiert (HOCKENBERY et al., 1990), die zweite Gruppe von Genen, wie Bax, induziert Apoptose (OLTVAI et al., 1993). Insbesondere die Ratio der Bax/Bcl-2-Expression gibt Auskunft über das Zellüberleben nach einem apoptotischen Stimulus (KORSMEYER et al., 1993). Akyurek et al. zeigten in ihrer Studie, dass bereits in der frühen Phase einer Herzinsuffizienz das Apoptose-Risiko der Myozyten erhöht ist und während des Fortschreitens der Krankheit immer mehr

ansteigt (AKYUREK et al., 2001). Auch unsere Daten belegten in der frühen Phase der Nachlasterhöhung eine Verschiebung der Bax/Bcl-2-Ratio in Richtung einer verstärkten Apoptose (Abbildung 32C, Abbildung 33C) in den Wildtyptieren.

Auch die Expression eines weiteren Tumorsuppressorgens, p16, war nur in der TAC-operierten Gruppe der Wildtypmäuse erhöht (Abbildung 32B, Abbildung 33B). P16 induziert während des Zellzyklus einen Arrest in der G1- Phase. Somit wirkt p16 antiproliferatorisch und bewirkt eine Seneszenz der Zellen ((WERNER et al., 2008).

Insgesamt beeinflusst das Fehlen von TRIF durch die Reduktion der primären inflammatorischen Zellantwort in der frühen Phase des kardialen Remodelings, das Zellüberleben der Kardiomyozyten positiv.

5.9. Das Fehlen von TRIF verlangsamt die Entstehung eines hypertrophen Phänotyps

Wie Nakamura et al. bereits 2001 zeigten, entwickelt sich nach Nachlasterhöhung durch TAC zwar relativ schnell eine Hypertrophie, aber das Herz kompensiert den hämodynamischen Stress in den ersten Tagen nach OP ebenso schnell, sodass an Tag 10 post OP die prozentuale Auswurfraction (EF) wieder auf dem Ausgangsspiegel angelangt ist und dann unverändert gut bleibt, wie Messungen an Tag 20 belegten (NAKAMURA et al., 2001). In unseren Versuchen waren, ähnlich zu den Erkenntnissen von Nakamura, echokardiographisch keine größeren Unterschiede der EF zwischen Kontrolltieren und TAC-operierten Tieren nachzuweisen. Die hämodynamischen Messungen an Tag 7 legen nahe, dass die LV-Pumpfunktion in den TRIF-defizienten Mäusen insgesamt etwas weniger durch die erhöhte Nachlast beeinflusst zu sein scheint bzw. sich schneller zu regeneriert scheint als in den Wildtypmäusen. Im Gegensatz zu Nakamura war an Tag 35 die echokardiographisch und mit der Working Heart Methode dargestellte EF in den TAC-Mäusen beider Gruppen deutlich reduziert. Wenn an Tag 20 das Herz noch in der Lage ist, den erhöhten hämodynamischen Stress zu kompensieren, so ist dies 14 Tage später aufgrund zunehmender Wanddicke und Steifigkeit und nicht mehr möglich. Da sich an Tag 70 mit der Working heart Methode keine weitere Verschlechterung der EF bei den TAC-Tieren zeigte, scheint es in dieser späten Phase der Hypertrophie zu keinen ausgeprägten Remodelingprozessen mehr zu

Diskussion

kommen. Hingegen scheint sich die Einschränkung der Herzleistung, hier insbesondere der diastolischen Pumpfunktion (Cardiac Output und Schlagvolumen) erst im späteren Verlauf der Hypertrophie auszuwirken. Wie bereits in anderen Studien gezeigt (NAKAMURA et al., 2001), nimmt die linkventrikuläre Masse und linksventrikuläre Hinterwanddicke nach TAC innerhalb der 1. Woche bereits signifikant zu. Wir konnten zeigen, dass das Fehlen von TRIF das maladaptive Remodeling zum frühen Zeitpunkt verlangsamt. Es kommt deutlich später zu einer Zunahme der Wanddicke und der linksventrikulären Masse. An Tag 35 post OP war die Mehrzahl der untersuchten Parameter in beiden Gruppen vergleichbar. Sodass man davon ausgehen kann, dass das Ausschalten von TRIF langfristig gesehen die Entstehung des hypertrophen Phänotyps nicht verhindern kann. Wenn auch durch das Ausschalten von TRIF die Ausprägung der Hypertrophie nicht gemildert werden kann, so zeigen aber unsere Daten, dass aber zumindest die Progression verlangsamt werden kann.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der TRIF-Signalweg bei nachlastinduzierten Remodeling modulierend mitwirkt und die Progression der Hypertrophie verlangsamt. Dabei ist der Einfluss von TRIF hauptsächlich auf den frühen Zeitpunkt beschränkt.

5.10. Schlussfolgerung: TRIF-abhängige TGF-beta Expression und Fibrose moduliert nachlastabhängiges myokardiales Remodeling

Unsere Ergebnisse zeigen, dass TRIF beim nachlastinduzierten Remodeling post-inflammatorisch an mehreren Stellen regulierenden Einfluss nimmt. Eine TRIF-Defizienz bremst im frühen Stadium des maladaptiven Remodelings nach Nachlasterhöhung die Progredienz der Herzinsuffizienz. Im Verlauf des maladaptiven Remodelings kommt es zu einer Verlagerung der Signalwege. Die primären, durch inflammatorische Auslöser in Gang gesetzten Signalwege verlieren an Bedeutung und somit wird auch die TRIF-abhängige Regulation durch andere Regulierungsmechanismen ersetzt. So ist es auch zu erklären, dass durch das Fehlen von TRIF, auf lange Sicht gesehen, keinen Einfluss auf funktionelle Parameter ausgeübt wird.

Aufgrund der gewonnen Erkenntnisse ergibt sich die unter Abbildung 39 dargestellte hypothetische TRIF-abhängige Regulation von Signalwegen beim nachlastinduziertem maladaptiven Remodeling. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass der TRIF-abhängige Signalweg in allen Zelltypen bei kardialen Remodeling eine Rolle spielt und sowohl Apoptose als auch Proliferation zelltypspezifisch mitreguliert. Sicher ist, dass TRIF in frühem Stadium nach Nachlasterhöhung die vermehrte Ausschüttung inflammatorischer Zytokine induziert. Der TRIF Signalweg scheint aber insbesondere bei der Entstehung der Fibrose involviert zu sein. So zeigen unsere Ergebnisse, dass TGF-beta direkt durch TRIF reguliert wird. Aber auch im Verlauf der TGF-beta-Signalkaskade wirkt TRIF an unterschiedlichsten Stellen regulierend ein, sei es bei der Aktivierung von miRNAs als auch bei der Regulation des Smad-Signalwegs.

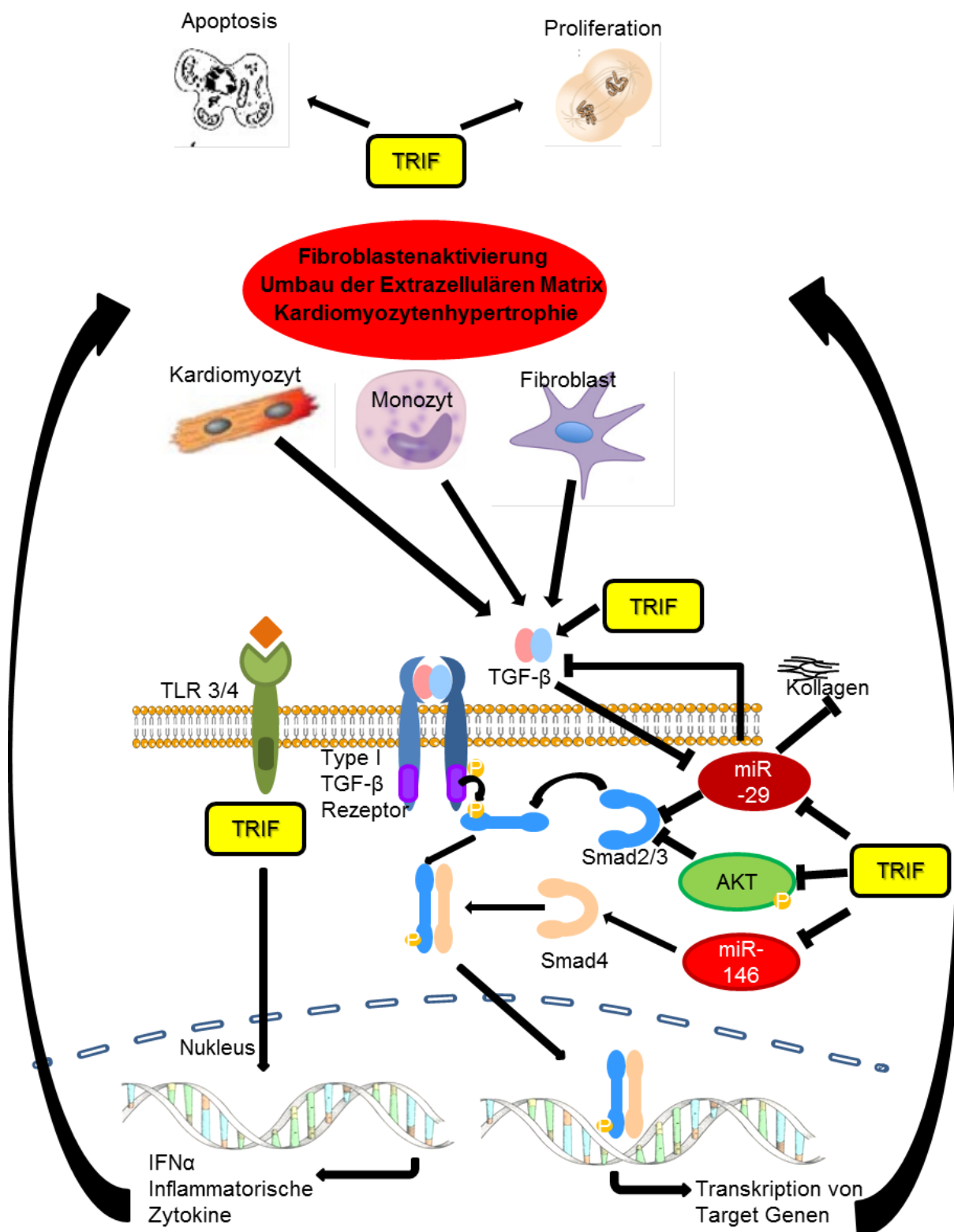


Abbildung 39: Mögliche TRIF-abhängige Regulation beim maladaptiven Remodeling

Durch inflammatorische Stimuli wird TLR3 und TLR4 vermittelt über den TRIF-Signalweg die Expression inflammatorischer Zytokine veranlasst. Es kommt zur TGF-beta-Expression und Aktivierung des TGF-beta-Signalweges. TRIF scheint direkten Einfluss auf die TGF-beta-Expression zu haben, aber auch downstream hat die Anwesenheit von TRIF eine Rolle bei der Inhibition von miR-29 und miR-146, ebenso wie auf die Phosphorylierung von Akt und moduliert somit den Smad-Signalweg und die Kollagenbildung.

6. Literaturverzeichnis

1. Akira S (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278:38105 - 38108
2. Akira S, Yamamoto M, Takeda K (2003) Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 31:637-642
3. Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511
4. Akyurek O, Akyurek N, Sayin T, Dincer I, Berkalp B, Akyol G, Ozenci M, Oral D (2001) Association between the severity of heart failure and the susceptibility of myocytes to apoptosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 80:29-36
5. Attisano L, Wrana JL (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296:1646-1647
6. Barnard JA, Lyons RM, Moses HL (1990) The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta* 1:79-87
7. Beisvag V, Lehre PK, Midelfart H, Aass H, Geiran O, Sandvik AK, Laegreid A, Komorowski J, Ellingsen O (2006) Aetiology-specific patterns in end-stage heart failure patients identified by functional annotation and classification of microarray data. *Eur J Heart Fail* 8:381-389
8. Beisvag V, Kemi OJ, Arbo I, Loennechen JP, Wisloff U, Langaas M, Sandvik AK, Ellingsen O (2009) Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 16:690-697
9. Ben-Haim S, Gacinovic S, Israel O (2009) Cardiovascular infection and inflammation. *Semin Nucl Med* 39:103-114
10. Benedict CR, Weiner DH, Johnstone DE, Bourassa MG, Ghali JK, Nicklas J, Kirlin P, Greenberg B, Quinones MA, Yusuf S (1993) Comparative neurohormonal responses in patients with preserved and impaired left ventricular ejection fraction: results of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Registry. The SOLVD Investigators. *J Am Coll Cardiol* 22:146A-153A
11. Beutler B (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430:257-263
12. Bowers SLK, Banerjee I, Baudino TA (2010) The extracellular matrix: At the center of it all. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48:474-482
13. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Jr., Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL (1998) Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 97:1382-1391
14. Bozkurt B, Mann DL, Deswal A (2010) Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Fail Rev* 15:331-341
15. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS (2005) The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:657-687
16. Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B (1998) Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation* 97:1375-1381
17. Buja LM, Vela D (2008) Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc Pathol* 17:349-374
18. Casscells W, Bazoberry F, Speir E, Thompson N, Flanders K, Kondaiah P, Ferrans VJ, Epstein SE, Sporn M (1990) Transforming growth factor-beta 1 in normal heart and in myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci* 593:148-160
19. Ceci M, Gallo P, Santonastasi M, Grimaldi S, Latronico MV, Pitisci A, Missol-Kolka E, Scimia MC, Catalucci D, Hilfiker-Kleiner D, Condorelli G Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice by increasing

-
- angiogenesis and reducing apoptosis, *Cell Death Differ.* 2007 May;14(5):1060-2. Epub 2007 Jan 19.).
20. Chen J, Baig E, Fish EN (2004) Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res* 24:687-698
 21. Chen X-Q, Zhang D-L, Zhang M-J, Guo M, Zhan Y-Y, Liu F, Jiang W-F, Zhou L, Zhao L, Wang Q-X, Liu X (2015a) TRIF promotes angiotensin II-induced cross-talk between fibroblasts and macrophages in atrial fibrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464:100-105
 22. Chen XQ, Liu X, Wang QX, Zhang MJ, Guo M, Liu F, Jiang WF, Zhou L (2015b) Pioglitazone inhibits angiotensin II-induced atrial fibroblasts proliferation via NF-kappaB/TGF-beta1/TRIF/TRAF6 pathway. *Exp Cell Res* 330:43-55
 23. Chien KR (1999) Stress pathways and heart failure. *Cell* 98:555-558
 24. Chung E, Yeung F, Leinwand LA (1985) Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation. *J Appl Physiol* 112:1564-1575
 25. Cingolani OH, Yang XP, Liu YH, Villanueva M, Rhaleb NE, Carretero OA (2004) Reduction of cardiac fibrosis decreases systolic performance without affecting diastolic function in hypertensive rats. *Hypertension* 43:1067-1073
 26. Damas JK, Eiken HG, Oie E, Bjerkeli V, Yndestad A, Ueland T, Tonnessen T, Geiran OR, Aass H, Simonsen S, Christensen G, Froland SS, Attramadal H, Gullestad L, Aukrust P (2000) Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 47:778-787
 27. de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ (2007) Type I Interferon Receptors: Biochemistry and Biological Functions. *Journal of Biological Chemistry* 282:20053-20057
 28. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ (2006) Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 113:2097-2104
 29. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL (2001) Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 103:2055-2059
 30. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG (2011) Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 51:600-606
 31. Dorn GW, Robbins J, Sugden PH (2003) Phenotyping Hypertrophy: Eschew Obfuscation. *Circulation Research* 92:1171-1175
 32. Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B (1991) Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res* 69:483-490
 33. Ehrentraut H, Weber C, Ehrentraut S, Schwederski M, Boehm O, Knuefermann P, Meyer R, Baumgarten G (2011) The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy. *Eur J Heart Fail* 13:602-610
 34. Ehrentraut H, Felix Ehrentraut S, Boehm O, El Aissati S, Foltz F, Goelz L, Goertz D, Kebir S, Weisheit C, Wolf M, Meyer R, Baumgarten G (2015) Tlr4 Deficiency Protects against Cardiac Pressure Overload Induced Hyperinflammation. *PLoS One* 10
 35. Frangogiannis NG (2008) The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research* 58:88-111
 36. Frey N, Olson EN (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65:45-79
 37. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA (2004) Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109:1580-1589
 38. Fuchs M, Drexler H (2004) [Mechanisms of inflammation in heart failure]. *Herz* 29:782-787
 39. Gallucci S, Matzinger P (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13:114-119

40. Gladka MM, da Costa Martins PA, De Windt LJ (2012) Small changes can make a big difference - microRNA regulation of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 52:74-82
41. Gullestad L, Aukrust P (2005) Review of trials in chronic heart failure showing broad-spectrum anti-inflammatory approaches. *Am J Cardiol* 95:17C-23C; discussion 38C-40C
42. Ha T, Li Y, Hua F, Ma J, Gao X, Kelley J, Zhao A, Haddad GE, Williams DL, William Browder I, Kao RL, Li C (2005) Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovasc Res* 68:224-234
43. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279
44. Heger J, Peters SC, Piper H-M, Euler G (2009) SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes. *Journal of Cellular Physiology* 220:515-523
45. Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer EP, Klovekorn WP, Schaper J (2003) Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107:984-991
46. Heymans S, Hirsch E, Anker SD, Aukrust P, Balligand JL, Cohen-Tervaert JW, Drexler H, Filippatos G, Felix SB, Gullestad L, Hilfiker-Kleiner D, Janssens S, Latini R, Neubauer G, Paulus WJ, Pieske B, Ponikowski P, Schroen B, Schultheiss HP, Tschope C, Van Bilsen M, Zannad F, McMurray J, Shah AM (2009) Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 11:119-129
47. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-336
48. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim S, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S (2003) Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743 - 748
49. Hsueh WA, Law RE, Do YS (1998) Integrins, adhesion, and cardiac remodeling. *Hypertension* 31:176-180
50. Hunter JJ, Chien KR (1999) Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 341:1276-1283
51. Hutchinson KR, Stewart Jr JA, Lucchesi PA (2010) Extracellular matrix remodeling during the progression of volume overload-induced heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48:564-569
52. Ionita MG, Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G (2010) Endogenous inflammatory molecules engage Toll-like receptors in cardiovascular disease. *J Innate Immun* 2:307-315
53. Jiang DS, Zhang XF, Gao L, Zong J, Zhou H, Liu Y, Zhang Y, Bian ZY, Zhu LH, Fan GC, Zhang XD, Li H (2014) Signal regulatory protein- α protects against cardiac hypertrophy via the disruption of toll-like receptor 4 signaling. *Hypertension* 63:96-104
54. Kaczorowski DJ, Nakao A, McCurry KR, Billiar TR (2009a) Toll-like receptors and myocardial ischemia/reperfusion, inflammation, and injury. *Curr Cardiol Rev* 5:196-202
55. Kaczorowski DJ, Nakao A, Vallabhaneni R, Mollen KP, Sugimoto R, Kohmoto J, Zuckerbraun BS, McCurry KR, Billiar TR (2009b) Mechanisms of Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammation after cold ischemia/reperfusion in the heart. *Transplantation* 87:1455-1463
56. Kaczorowski DJ, Tsung A, Billiar TR (2009c) Innate immune mechanisms in ischemia/reperfusion. *Front Biosci (Elite Ed)* 1:91-98
57. Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL (1995) Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 96:1042-1052
58. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt P, Sato S, Hoshino K, Akira S (2001) Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of

-
- IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167:5887 - 5894
59. Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825
 60. Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384
 61. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bultmann B, Muller T, Lindinger A, Bohm M (2008) Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 118:639-648
 62. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4:327-332
 63. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Demetris AJ, Feldman AM (1997) Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice. *J Card Fail* 3:117-124
 64. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Takeya M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T (2004) Hypertensive myocardial fibrosis and diastolic dysfunction: another model of inflammation? *Hypertension* 43:739-745
 65. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann J (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973 - 983
 66. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P (1998) Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* 101:1326-1342
 67. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M (1990) Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 323:236-241
 68. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322:1561-1566
 69. Li YH, Ha TZ, Chen Q, Li CF (2005) [Role of MyD88-dependent nuclear factor-kappaB signaling pathway in the development of cardiac hypertrophy in vivo]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 85:267-272
 70. Lin M, Zhao L, Zhao W, Weng J (2014) Dissecting the mechanism of carotid atherosclerosis from the perspective of regulation. *Int J Mol Med* 34:1458-1466
 71. Liu Y, Taylor NE, Lu L, Usa K, Cowley AW, Jr., Ferreri NR, Yeo NC, Liang M (2010) Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes. *Hypertension* 55:974-982
 72. Long X, Boluyt MO, Hipolito ML, Lundberg MS, Zheng JS, O'Neill L, Cirielli C, Lakatta EG, Crow MT (1997) p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of Clinical Investigation* 99:2635-2643
 73. Mann DL (2002) Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res* 91:988-998
 74. Mann DL (2005) Targeted Anticytokine Therapy and the Failing Heart. *Am J Cardiol* 95:9-16
 75. Mann DL (2011) The Emerging Role of Innate Immunity in the Heart and Vascular System: For Whom the Cell Tolls. *Circulation Research* 108:1133-1145
 76. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS (2000) Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H1534-1539
 77. Mohamed BA, Schnelle M, Khadjeh S, Lbik D, Herwig M, Linke WA, Hasenfuss G, Toischer K (2015) Molecular and structural transition mechanisms in long-term volume overload. *Eur J Heart Fail* 23:465
 78. Molkentin JD, Dorn GW, 2nd (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63:391-426

Literaturverzeichnis

79. Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, Yee RR, Simpson PC, Grossman W, Foster E (2001) LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1104-1112
80. Nishimura M, Naito S (2005) Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull* 28:886-892
81. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P (1997) Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336:1131-1141
82. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-619
83. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA (2006) Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 367:356-367
84. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T (2003) TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167
85. Packard RR, Lichtman AH, Libby P (2009) Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol* 31:5-22
86. Parker TG, Packer SE, Schneider MD (1990) Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 85:507-514
87. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J, Schwimmbeck PL, Noutsias M, Schultheiss HP (2002) [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz* 27:677-682
88. Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202:8-32
89. Platanias LC (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5:375-386
90. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085 - 2088
91. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, Niebauer J, Hooper J, Volk HD, Coats AJ, Anker SD (2000) Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 102:3060-3067
92. Reed JC (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124:1-6
93. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J, Jr., Chien KR (1991) Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8277-8281
94. Rost R (1997) The athlete's heart. Historical perspectives--solved and unsolved problems. *Cardiol Clin* 15:493-512
95. Sadoshima J, Izumo S (1997) The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59:551-571
96. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkenstein JD, Zou Y, Komuro I (2007) p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 446:444-448
97. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13:539-548
98. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL (1996) Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J Card Fail* 2:243-249
99. Singh MV, Cicha MZ, Meyerholz DK, Chapleau MW, Abboud FM (2015) Dual Activation of TRIF and MyD88 Adaptor Proteins by Angiotensin II Evokes Opposing Effects on Pressure, Cardiac Hypertrophy, and Inflammatory Gene Expression. *Hypertension* 66:647-656

Literaturverzeichnis

100. Spinale FG (2002) Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 90:520-530
101. Stanton LW, Garrard LJ, Damm D, Garrick BL, Lam A, Kapoun AM, Zheng Q, Protter AA, Schreiner GF, White RT (2000) Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ Res* 86:939-945
102. Stewart WE, 2nd (1980) Interferon nomenclature recommendations. *J Infect Dis* 142:643
103. Sugden PH (2001) Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *Ann Med* 33:611-622
104. Takahashi N, Calderone A, Izzo Jr NJ, Mäki TM, Marsh JD, Colucci WS (1994) Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor- β 1 expression in rat ventricular myocytes. *Journal of Clinical Investigation* 94:1470-1476
105. Tijssen AJ, van der Made I, van den Hoogenhof MM, Wijnen WJ, van Deel ED, de Groot NE, Alekseev S, Fluiter K, Schroen B, Goumans MJ, van der Velden J, Duncker DJ, Pinto YM, Creemers EE (2014) The microRNA-15 family inhibits the TGF β -pathway in the heart. *Cardiovasc Res*
106. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL (1996) Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 27:1201-1206
107. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:13027-13032
108. Villarreal FJ, Dillmann WH (1992) Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF- β 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 262:H1861-1866
109. Wang J, Xu N, Feng X, Hou N, Zhang J, Cheng X, Chen Y, Zhang Y, Yang X (2005) Targeted disruption of Smad4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 97:821-828
110. Weber KT (2000) Targeting Pathological Remodeling: Concepts of Cardioprotection and Reparation. *Circulation* 102:1342-1345
111. Werner C, Hanhoun M, Widmann T, Kazakov A, Semenov A, Poss J, Bauersachs J, Thum T, Pfreundschuh M, Muller P, Haendeler J, Bohm M, Laufs U (2008) Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways, and apoptosis. *J Am Coll Cardiol* 52:470-482
112. Widmer RJ, Chung WY, Herrmann J, Jordan KL, Lerman LO, Lerman A (2014) The Association between Circulating MicroRNA Levels and Coronary Endothelial Function. *PLoS One* 9:e109650
113. Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, Frangogiannis N (2009a) Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochemistry and Cell Biology* 131:471-481
114. Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, Frangogiannis NG (2009b) Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochemistry and Cell Biology* 131:471-481
115. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2002) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169:6668-6672
116. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640 - 643
117. Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T (1998) Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 17:1087 - 1095
118. Zhong H, Wang H-r, Yang S, Zhong J-h, Wang T, Wang C, Chen F-y (2010) Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF- β pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line. *International Journal of Hematology* 92:129-135

119. Zhou L, Wang L, Lu L, Jiang P, Sun H, Wang H (2012) Inhibition of miR-29 by TGF-beta-Smad3 signaling through dual mechanisms promotes transdifferentiation of mouse myoblasts into myofibroblasts. PLoS One 7:16

7. Publikationen/Dank

7.1. Abstrakt-Publikationen

- 1) **Bettink S**, Walenta KL, Schirmer SH, Böhm M, Laufs U, Friedrich EB. SDF1/CXCR4-Signaling Contributes to Myocardial Remodeling. Abstract: (V537) Freier Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2010
- 2) **Bettink SI**, Böhm M, Laufs U, Schirmer SH. Inhibition of TRIF-dependent Inflammation Attenuates Afterload-induced Myocardial Remodeling Abstract: (V688)) Freier Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2012
- 3) Schirmer SH, **Bettink SI**, Kazakov A, Koerbel C, Boehm M, Laufs U. TRIF-dependent inflammation promotes afterload-induced cardiac remodeling, Abstract: (P818) Posterpräsentation auf der Jahrestagung der European Society of Cardiology (ESC) 2012
- 4) **Bettink SI**, Körbel C, Reil JC. Kazakov A. Degen A, Böhm M, Laufs U, Schirmer SH TRIF-abhängige Inflammation verstärkt Nachlast-induziertes myokardiales Remodeling. Abstract: (P1377) DGK 2013
- 5) Degen A, Müller A, **Bettink S**, Böhm M, Laufs U, Schirmer SH) Inhibition der TRIF-abhängigen Inflammation führt zur Modulation inflammatorischer Zytokine, verminderter Akt-Expression und verminderter linksventrikulärer Dilatation nach Myokardinfarkt. Abstract: (V838) Freier Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) DGK 2013
- 6) Schirmer SH, Kratz MT, **Bettink S**, Degen A, Kazakov A, Nylander S, Baumhäkel M, Laufs U, Böhm M. Inhibition des Adenosindiphosphat-Rezeptors P2Y₁₂ reduziert Atherosklerose und Inflammation in der hyperlipidämischen Apolipoprotein E – defizienten Maus. Abstract: (V524) Freier Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) DGK 2013
- 7) Schirmer SH, Van Der Pouw-Kraan TCT, **Bettink SI**, Mahfoud F, Laufs U, Horrevoets AJG, Boehm M. Renal artery denervation affects the circulating microRNA profile in patients with resistant arterial hypertension. European Heart Journal, 2013; 34(suppl. 1):P559-P559

- 8) Millenaar D, Degen A, **Bettink S**, Böhm M, Laufs U, Schirmer SH, Makrophagendepletion durch Clodronat-Liposomen inhibiert trainings-induziertes Kollateralarterienwachstum. Abstract: (P764) Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) 2014
- 9) Tomić M, Degen A, **Bettink SI**, Laufs U, Böhm M, Schirmer SHS. Role of TRIF – dependent inflammatory signaling in collateral artery growth, Abstract: (P3437) Posterpräsentation auf der Jahrestagung der European Society of Cardiology (ESC) 2014

7.2. Original-Arbeiten

- 1) **Bettink S**, Wullich B, Christmann A, Zwergel T, Zang KD, Unteregger G. Genetic heterogeneity of prostatic carcinoma-derived cell lines as emphasized by DNA fingerprinting. *Electrophoresis*. 1992 Sep-Oct;13(9-10):644-6.
- 2) **Bettink SI**, Werner C; Chen C-H, Müller P; Schirmer SH Walenta KL, Böhm M, Laufs U, Friedrich EB. Integrin-linked kinase is a central mediator in angiotensin II type 1- and chemokine receptor CXCR4 signaling in myocardial hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010; 397(2): 208-213.
- 3) Walenta KL, **Bettink S**, Böhm M, Friedrich E. Differential chemokine receptor expression regulates functional specialization of endothelial progenitor cell subpopulations. *Basic Research in Cardiology*, 2011;106(2): 299-305
- 4) Schirmer SH, Millenaar DN, Werner C, Schuh L, Degen A, **Bettink SI**, Lipp P, van Rooijen N, Meyer T, Böhm M, Laufs U. Exercise Promotes Collateral Artery Growth Mediated by Monocytic Nitric Oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015; 35(8):1862-71
- 5) Clever YP, Peters D, Calisse J, **Bettink S**, Berg MC, Sperling C, Stoeve M, Cremers B, Kelsch B, Böhm M, Speck U, Scheller B. Novel Sirolimus–Coated Balloon Catheter: In Vivo Evaluation in a Porcine Coronary Model. *Circ Cardiovasc Interv*. 2016 Apr;9(4)
- 6) **Bettink SI**, Reil JC, Körbel C, Kasakov A, Laufs U, Böhm M, Schirmer SH, Inhibition of TRIF-dependent Inflammation Attenuates Afterload-induced Myocardial Remodeling, in Vorbereitung

7.3. Danksagung

Herrn Professor Dr. Veit Flockerzi danke ich herzlich für Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Ebenso herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Böhm für die Aufnahme in seine Forschergruppe, die Überlassung des wissenschaftlich sehr interessanten Themas, die Begutachtung der vorliegenden Arbeit, seine Unterstützung, seine engagierte Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses und für die Möglichkeit, Teile dieser Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen.

Herrn PD. Dr. Eric Friedrich danke ich dafür, dass er es mir ermöglicht hat, aus der freien Wirtschaft wieder zurück in die universitäre Forschung zu kommen, um meine akademische Ausbildung abzuschließen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn PD. Dr. Dr. Stephan Schirmer, der nach dem Ausscheiden von Herrn Friedrich die Arbeitsgruppe übernahm. Er gab meiner Promotion eine neue Ausrichtung und unterstützte meine Arbeit durch eine hervorragende wissenschaftliche Betreuung, stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, Motivation, Vertrauen und Enthusiasmus.

Herrn Prof. Dr. Scheller danke ich für die Möglichkeit, während der Beschäftigung in seiner Arbeitsgruppe meine Arbeit zu einem erfolgreichen Ende zu bringen.

Herrn Prof. Dr. Laufs danke ich dafür, dass er es mir ermöglichte die TAC-OPs von seiner erfahrenen MTA durchführen zu lassen. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Ellen, die diese OPs mit der ihr eigenen Gründlichkeit und Gewissenhaftigkeit erledigte.

Dr. Christina Körbel danke ich für die Durchführung und stundenlange Auswertung der Echokardiographie und für ihre Hilfsbereitschaft.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Jan Reil und Jeannette für die Durchführung und Auswertung des „Working Hearts“.

Den Herrn Prof. Dr. Menger und den Tierpflegern des Tierstalls des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie danke ich für die Bereitstellung der Haltungsplätze und für die zuverlässige Versorgung meiner Versuchstiere.

Publikationen/Dank

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei den TAs unserer Arbeitsgruppe, Julia und Nina, die mich bei der Durchführung meiner Arbeiten tatkräftig und zuverlässig unterstützt haben.

Andrej gilt ein Dank für seine Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei immunhistochemischen Fragen.

Den Mitarbeitern der kardiologischen Forschung der Inneren Medizin III, Simone, Bianca, Nicole, Kathrin, Claudia, Michelle, Sarah, Matze und alle, die ich jetzt vergessen habe, sei ein Dank für die schöne und produktive Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung.

Mein größter Dank gebührt meiner Familie für all ihre Unterstützung, die Motivation und den Halt, den sie mir gibt und gegeben hat

Ihr ist diese Arbeit gewidmet.

8. Lebenslauf